



UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
CARRERA DE QUÍMICA DE ALIMENTOS

*Evaluación in vitro del efecto bactericida de cepas nativas de
Lactobacillus sp. contra Salmonella sp., Salmonella typhi y Escherichia
coli.*

Autor: Vanessa Elizabeth Torres Enríquez
vanely_1986@hotmail.com

Tesis para optar por el Título profesional de
QUÍMICA DE ALIMENTOS.

Tutor: Dra. Blanca Esthela Bravo Romero MSc.
blancabravor@hotmail.com

Quito, Junio del 2013

Torres Enríquez, Vanessa Elizabeth (2013). Evaluación in vitro del efecto bactericida de cepas nativas de *Lactobacillus sp.* contra *Salmonella sp*, *Salmonella typhi*. y *Escherichia coli*. Trabajo de investigación para optar por el grado de Química de Alimentos. Carrera de Química de Alimentos. Quito: 88 p.

DEDICATORIA

La presente tesis la dedico a Dios, quién ha sabido guiarme por el camino del bien, brindarme la fortaleza necesaria para seguir adelante y ayudarme a enfrentar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento.

A mis padres por su apoyo, comprensión, amor y por ayudarme con los recursos necesarios para estudiar. Su tenacidad y lucha incansable los ha convertido en un gran ejemplo a seguir. Me enseñaron todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi perseverancia, y mi coraje para luchar por mis objetivos.

A mis hermanos por estar siempre presentes, acompañándome a cada paso de mi camino.

A todos mis amigos que siempre tuvieron la palabra precisa en cada momento, que confiaron en mí, me ayudaron y porque hicieron de mi etapa universitaria un trayecto lleno de vivencias que jamás olvidaré.

A mi Danny, quien con su cariño y apoyo me ha dado fortaleza y me ha ayudado a seguir adelante sin dejar de incentivar me ni un solo día.

Gracias infinitas a todos por las muestras desinteresadas de cariño.

“Para el logro del triunfo siempre ha sido indispensable pasar por la senda de los sacrificios.” Simón Bolívar

AGRADECIMIENTOS

Por lo alcanzado en mi formación personal y en mi carrera universitaria agradezco a Dios, a mi familia y amigos.

De manera muy especial quiero agradecer a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador y a todos sus docentes por la formación académica y recursos que me han sido brindados.

A mi Tutora de Tesis, mi querida Dra. Blanca E. Bravo, por la paciencia, colaboración y motivación que me ha brindado para realizar la investigación y por compartir conmigo sus amplios conocimientos y experiencias.

A mis queridas docentes miembros del tribunal, Ing. Milene Díaz y Dra. Isabel Fierro por su predisposición permanente a pesar de sus múltiples ocupaciones y por sus sugerencias valiosas durante la elaboración de mi tesis.

A todas les ofrezco mis sinceros agradecimientos.

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
CARRERA DE QUÍMICA DE ALIMENTOS

Yo, Vanessa Elizabeth Torres Enríquez, en calidad de autor de la tesis realizada sobre “EVALUACIÓN IN VITRO DEL EFECTO BACTERICIDA DE CEPAS NATIVAS DE *Lactobacillus sp.* CONTRA *Salmonella sp.*, *Salmonella typhi*. Y *Escherichia coli*.”, por la presente autorizo a la UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR, hacer uso de todos los contenidos que me pertenecen o de parte de los que contienen esta obra, con fines estrictamente académicos o de investigación.

Los derechos que como autor me corresponden, con excepción de la presente autorización, seguirán vigentes a mi favor, de conformidad con lo establecido en los artículos 5, 6, 8, 19 y demás pertinentes de la Ley de Propiedad Intelectual y su Reglamento.

Quito, a los 24 días del mes de Junio del 2013



Vanessa E. Torres E.

C.C. 1719043836



UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
CARRERA DE QUÍMICA DE ALIMENTOS



INFORME DE APROBACIÓN DE LA TESIS POR PARTE DEL TUTOR

Por la presente, dejo constancia que he leído la Tesis presentada por el señor o la señorita Vanessa Elizabeth Torres Enriquez, para optar por el título profesional de Químico de Alimentos, cuyo tema es: *EVALUACIÓN IN VITRO DEL EFECTO BACTERICIDA DE CEPAS NATIVAS DE Lactobacillus sp. CONTRA Salmonella sp., Salmonella typhi. Y Escherichia coli*, la misma que reúne los requerimientos y los méritos suficientes para ser sometido a evaluación por el Tribunal Calificador.

En la ciudad de Quito, a los 24 días del mes de Junio de 2013

Dra. Blanca Estela Bravo

C.I. 1704663200



UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
CARRERA DE QUÍMICA DE ALIMENTOS



INFORME DEL TRIBUNAL CALIFICADOR DE LA TESIS

Quito, 24 de Junio del 2013

Señor

Dr. Wilson Parra

DECANO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Presente

Señor Decano:

El Tribunal encargado de calificar la Tesis: *EVALUACIÓN IN VITRO DEL EFECTO BACTERICIDA DE CEPAS NATIVAS DE Lactobacillus sp. CONTRA Salmonella sp., Salmonella typhi, Y Escherichia coli*, presentada por la Srta. Vanessa Elizabeth Torres Enriquez, estudiante de la Carrera de Química de Alimentos, luego del estudio y revisión correspondiente, resolvió:

APROBAR ☒ la Tesis con la NOTA de: 20/20 puntos

REPROBAR ☐ la Tesis.

Es cuanto podemos informar.

Atentamente,

Dra. Blanca Estela Bravo

CC: 1704663200

Dra. Isabel Fierro

CC: 0600921746

Ing. Milene Díaz

CC: 1711274066

LUGAR DONDE SE REALIZÓ LA INVESTIGACIÓN

El trabajo de investigación en su fase experimental, se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador.

CONTENIDO

pág.

1. EL PROBLEMA.....	1
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
1.2. OBJETIVOS.....	2
1.2.1. Objetivo general.....	2
1.2.2. Objetivos específicos.....	2
1.3. HIPÓTESIS	2
1.4. IMPORTANCIA Y JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	3
2. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1. ANTECEDENTES	4
2.2. FUNDAMENTO TEÓRICO	5
2.2.1. Probióticos	5
2.2.1.1. Criterios para un probiótico.....	5
2.2.1.2. Mecanismos de acción de los probióticos	6
2.2.1.3. Principales efectos benéficos de las bacterias del género <i>Lactobacillus</i>	7
2.2.2. Generalidades del género <i>Lactobacillus</i>	9
2.2.2.1. Género <i>Lactobacillus</i>	9
2.2.3. Bacteriocinas	13
2.2.3.1. Mecanismos de acción de las bacteriocinas	13

2.2.3.2. Bacteriocinas producidas por cepas del género <i>Lactobacillus</i>	15
2.2.4. Yogurt.....	16
2.2.5. Afecciones gastrointestinales	16
2.2.5.1. Salmonelosis.....	17
2.2.5.2. Fiebre Tifoidea	18
2.2.5.3. Infecciones intestinales provocadas por <i>Escherichia coli</i> comensal	18
3. METODOLOGÍA	20
3.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN	20
3.2. MUESTREO	20
3.2.1. Origen de las muestras de yogurt artesanal.....	20
3.2.2. Origen de las muestras de yogurt industrial	20
3.2.3. Características del sitio experimental	21
3.3. FASES EXPERIMENTALES.....	21
3.3.1. Primera Fase.....	21
3.3.1.1. Métodos microbiológicos de aislamiento	21
3.3.1.1.1. Aislamiento e Identificación de <i>Salmonella sp</i> de carne	21
3.3.1.1.2. Aislamiento e Identificación de <i>Escherichia coli</i> de chochos	21
3.3.1.1.3. Aislamiento e Identificación de <i>Lactobacillus sp.</i> de yogurt.....	21
3.3.1.2. Métodos de activación de cepas ATCC.....	21

	pág.
3.3.1.2.1. Activación de <i>Salmonella typhi</i> ATCC 14028.....	21
3.3.1.2.2. Activación de <i>Escherichia coli</i> ATCC 11775.....	22
3.3.1.3. Métodos de evaluación de antimicrobianos	22
3.3.1.3.1. Elección del medio de cultivo adecuado para la inhibición bacteriana.	22
3.3.1.3.2. Método de inhibición en caldo	23
3.3.1.3.3. Método de inhibición en agar	23
3.3.2. Segunda Fase.....	24
3.3.3. Tercera Fase	24
3.4. FACTORES EN ESTUDIO	24
3.5. TRATAMIENTOS	25
3.6. DISEÑO EXPERIMENTAL	27
3.6.1. Análisis estadístico	29
4. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	30
4.1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA.....	30
4.1.1. Aislamiento e identificación de <i>Salmonella sp.</i> de carne	30
4.1.2. Aislamiento e identificación de <i>Escherichia coli</i> de chochos	32
4.1.3. Aislamiento e identificación de <i>Lactobacillus sp.</i> de yogurt.....	34
4.1.3.1. Identificación bioquímica de las cepas de <i>Lactobacillus</i> aisladas..	35
4.2. ACTIVACIÓN Y CONFIRMACIÓN BIOQUÍMICA DE CEPAS ATCC.....	36
4.2.1. Activación y confirmación de <i>Salmonella typhi</i> ATCC 14028.....	36

4.2.2.	Activación de <i>Escherichia coli</i> ATCC 11775	36
4.3.	EVALUACIÓN DE ANTIMICROBIANOS PRODUCIDOS POR <i>LACTOBACILLUS</i>	38
4.3.1.	Evaluación del mejor medio de cultivo para la detección de antimicrobianos.	38
4.3.2.	Inhibición en caldo	39
4.3.3.	Inhibición en agar	41
4.4.	RESULTADOS DE LA SEGUNDA FASE EXPERIMENTAL.....	42
4.5.	RESULTADOS DE LA TERCERA FASE EXPERIMENTAL.....	42
4.6.	DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.	42
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	45
5.1.	CONCLUSIONES.....	45
5.1.1.	Producción de antimicrobianos.....	45
5.1.2.	Evaluación de factores ambientales	45
5.2.	RECOMENDACIONES	45
	BIBLIOGRAFÍA	47
	ANEXOS	49

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 2.1 Bacteriocinas producidas por bacterias del género <i>Lactobacillus</i>	15
Tabla 3.1. Laboratorio de Microbiología de Alimentos, Facultad de Ciencias Químicas.....	21
Tabla 3.2 Tratamientos para la determinación de la influencia de los cambios de pH.....	25
Tabla 3.3. Tratamientos para determinar la influencia de los cambios de T vs t.....	26
Tabla 3.4. Factores en estudio y sus niveles para la segunda fase.....	27
Tabla 3.5. Factores en estudio y sus niveles para la tercera fase.....	28
Tabla 3.6. Esquema del análisis de varianza.....	28
Tabla 4.1. Cepas de <i>Lactobacillus</i> aisladas en agar MRS.....	34
Tabla 4.2. Identificación bioquímica del género <i>Lactobacillus</i>	35
Tabla 4.3. Identificación bioquímica de las especies de <i>Lactobacillus</i> aisladas.....	35
Tabla 4.4. Bacterias patógenas aisladas para control de la actividad antimicrobiana.....	37
Tabla 4.5. Bacterias lácticas para la determinación de la actividad microbiana.....	37
Tabla 4.6. Bacterias – Medios de cultivo.....	38
Tabla 4.7. Inhibición de cepas ATCC en caldo MRS.....	39
Tabla 4.8. Inhibición de cepas aisladas de alimentos en caldo MRS.....	40
Tabla 4.9. Inhibición de cepas ATCC en agar MRS.....	41
Tabla 4.10. Inhibición de cepas aisladas de alimentos en agar MRS.....	41

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 2.1. Metabolismo homofermentativo de las BAL.....	10
Figura 2.2. Metabolismo heterofermentativo de las BAL	11

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo 1. Certificación de las Cepas ATCC	49
Anexo 2. Identificación de los <i>Lactobacillus</i> aislados	51
Anexo 3. Resultados de la inhibición en caldo.....	54
Anexo 4. Resultados de la inhibición en agar	66

RESUMEN DOCUMENTAL

El objetivo de la presente investigación, es determinar el efecto bactericida de cepas de *Lactobacillus* aisladas de muestras de yogurt comercializados en la ciudad de Quito; para ello se tomaron cuatro muestras de yogurt, y se lograron aislar cinco cepas de bacterias lácticas, de éstas, cuatro pertenecían a la especie *L. bulgaricus* y una cepa a la especie *L. rhamnosus*. Estas bacterias produjeron un extracto complejo de ácidos orgánicos y péptidos (bacteriocinas), propios del metabolismo bacteriano, cuya actividad bactericida fue evaluada. Los ensayos para determinar dicha acción se realizaron mediante dos métodos, especificados en la literatura y ensayados con anterioridad en experimentaciones previas, los métodos antes mencionados fueron: Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria y, Determinación de Antimicrobianos en Medio Sólido, valorados al enfrentarlos con bacterias como *Salmonella sp.*, *Salmonella typhi*, y *Escherichia coli*. Cada ensayo se realizó por triplicado y se utilizó una cepa de control para validar la inhibición.

Se concluyó que los extractos sintetizados por ambas cepas no tienen potencial bactericida contra sus dos similares que participan activamente en afecciones entéricas por lo que, se recomienda realizar un estudio posterior enfocado en los mecanismos de acción de las bacterias evaluadas.

Palabras Claves

MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS, YOGURT, BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS, *L. bulgaricus*, *L. rhamnosus*, CAPACIDAD BACTERICIDA, BACTERIOCINAS.

ABSTRACT

The objective of this investigation is to determine the bactericidal effect of *Lactobacillus* strains isolated from samples of yogurt sold in the city of Quito for this study were required four samples of yogurt, and succeeded in isolating five strains of lactic acid bacteria, of these, four belonging to the species *L. bulgaricus* and one strain of the species *L. rhamnosus*. These bacteria produce an extract complex organic acids and peptides (bacteriocins), characteristic of bacterial metabolism, whose bactericidal activity was evaluated. Assays for such action were performed using two methods, specified in the literature and previously tested in previous experiments, methods were: Determination of Minimum Inhibitory Concentration and Determination of Antimicrobial in Solid, valued at face them with bacteria such as *Salmonella sp.*, *Salmonella typhi*, and *Escherichia coli*. Each assay was performed in triplicate and used strain control for to validate the control inhibition.

It was concluded that extracts synthesized by both strains don't have potential similar bactericidal against his two actively involved in enteric diseases so it is recommended that further study focused on the mechanisms of action of the bacteria tested.

Keys

FOOD MICROBIOLOGY, YOGURT, LACTIC ACID BACTERIA, *L. bulgaricus*, *L. rhamnosus*, BACTERICIDAL CAPACITY, BACTERIOCINS

INTRODUCCIÓN

En el Ecuador el índice de patologías entéricas de origen bacteriano, ha tenido un incremento significativo en los últimos diecinueve años, ocupando así el tercer lugar dentro de las diez principales causas de ingresos hospitalarios. Este incremento se debe al déficit higiénico existente en la preparación y almacenamiento de los productos alimenticios que consumimos con frecuencia.

En nuestro país, el consumo de alimentos y suplementos con características benéficas ha ido en aumento debido a que existe la preocupación del consumidor por ingerir productos que aporten de manera positiva a la salud para evitar y prevenir enfermedades y sus implicaciones.

Dentro de este incremento comercial figuran los productos lácteos siendo el yogurt el de mayor consumo debido a que sus propiedades probióticas se mencionan frecuentemente en varios países alrededor del mundo y el consumo a nivel nacional se ha incrementado rápidamente en pocos años.

Una serie de estudios realizados en países como Nigeria, Colombia, España, Estados Unidos, etc. han demostrado el efecto benéfico de algunos microorganismos contra varios de estos agentes causales de infecciones no solo a nivel del tracto digestivo sino también en el tracto urinario. Entre estos microorganismos benéficos se encuentran los *Lactobacillus* cuyo hábitat son los productos fermentados de consumo masivo como el mencionado yogurt.

Es importante conocer las actividades probióticas que desarrollan los microorganismos que consumimos con el fin de aprovechar al máximo sus beneficios y quizá desarrollar nuevos productos nutritivos y benéficos.

El objetivo principal de la presente investigación es evaluar si las bacteriocinas producidas por las cepas aisladas de yogurt tienen capacidad inhibitoria frente a bacterias intestinales que son potencialmente productoras de patologías entéricas.

Para mencionado propósito se llevaron a cabo procedimientos que permitieron determinar si existía o no la inhibición bacteriana, con la ayuda de técnicas experimentales que permitieron determinar la concentración mínima inhibitoria de cada cepa y medir sus halos de inhibición. Estos procedimientos fueron verificados

mediante una cepa de control (cepa productora de bacteriocinas) que permitió comparar los resultados obtenidos.

La identificación de cada bacteria participante en esta investigación, se realizó bioquímicamente y para los microorganismos lácticos se contó con pruebas de análisis rápido (API CHL 50) con el fin de conocer ciertamente su especie.

1. EL PROBLEMA

1.1. Planteamiento del problema

En el Ecuador el índice de patologías entéricas, ha tenido un incremento significativo en los últimos diecinueve años, ocupando así el tercer lugar dentro de las diez principales causas de ingresos hospitalarios.

Entre los agentes bacterianos que tienen mayor frecuencia de aislamiento en mencionadas patologías tenemos a: *Shigella*, *Salmonella sp.*, *Escherichia coli*, *Campylobacter* y *Salmonella typhi* (agente causal de la fiebre tifoidea).

Este índice justifica su aumento debido a que los microorganismos que provocan la afección entérica son transmitidos por ingestión de alimentos contaminados, mal preparados, mal manipulados o mal conservados en los que las concentraciones de células viables y toxinas llegan a su nivel infectivo y ejercen su patogenicidad sobre el consumidor.

Entre los alimentos más frecuentes de contaminación en el Ecuador podemos mencionar frutas, hortalizas, carnes mal cocidas, productos lácteos, alimentos que contienen mayonesa, o que han sido preparados con anterioridad que no se mantuvieron en cadena de frío y alimentos sujetos a manipulación directa.

Dichos productos son consumidos con frecuencia por la gente joven y adulta en edades de 15 a 64 años que constituyen el 60,6% y representan un peligro potencial de infecciones frecuentes. (INEC, 2010)

Una serie de estudios realizados en países como Nigeria (Adeniyi, Ayeni, & Ogunbanwo, 2006), Colombia, España (Estrada, Gutierrez, & Montoya, 2005) y Estados Unidos (Gutierrez & Acosta, 2008) han demostrado el efecto benéfico de algunos microorganismos contra varios de estos agentes causales de infecciones no solo a nivel del tracto digestivo sino también en el tracto urinario.

Entre estos microorganismos benéficos se encuentran los *Lactobacillus* cuyo hábitat son los productos fermentados de consumo masivo como el yogurt.

En el Ecuador no hay estudios en los que se haya demostrado la influencia de los *Lactobacillus* de productos fermentados de consumo interno sobre bacterias causantes de patologías entéricas y, en base a su gran incidencia, es necesario un estudio que ayude a disminuir o prevenir mencionadas patologías en función de las propiedades antimicrobianas de estos microorganismos benéficos.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Evaluar el efecto bactericida de las cepas nativas de *Lactobacillus* sobre dos agentes patógenos: *Salmonella typhi* y *Salmonella sp.* y, un agente comensal *Escherichia coli*.

1.2.2. Objetivos específicos

- Aislar y caracterizar cepas de *Salmonella sp.* y *Escherichia coli* de alimentos.
- Aislar y caracterizar cepas de *Lactobacillus* presentes en varios yogures de mayor comercialización en Quito.
- Determinar la capacidad antimicrobiana de las cepas fermentadoras aisladas a diferentes condiciones de temperatura y pH.

1.3. Hipótesis

Ho.

Los microorganismos del género *Lactobacillus*, aislados de varios yogures comercializados en la ciudad de Quito, no tienen efecto bactericida sobre *Salmonella typhi*, *Salmonella sp.* y *Escherichia coli* frecuentes agentes causales de afecciones entéricas.

Ha.

Los microorganismos del género *Lactobacillus*, aislados de varios yogures comercializados en la ciudad de Quito, tienen efecto bactericida sobre

Salmonella typhi, *Salmonella sp.* y *Escherichia coli* frecuentes agentes causales de afecciones entéricas.

1.4. Importancia y justificación de la investigación

Los brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos pueden ocasionar perjuicios en el comercio y turismo provocando pérdidas de ingresos, desempleo y litigios.

Los niveles de inocuidad alimentaria en nuestro país no son los adecuados debido al poco control que la autoridad sanitaria ejerce y a la inexistencia de programas de capacitación sobre la manipulación de alimentos.

En el Ecuador las afecciones entéricas son muy frecuentes; según datos obtenidos del Ministerio de Salud Pública, en el país se han presentado alrededor de 3812 casos de salmonelosis y 4358 enfermedades diarreicas de origen bacteriano confirmados para el año 2009. (MSP, 2009).

Según la Organización Panamericana de la Salud, en el Ecuador las enfermedades diarreicas y gastrointestinales de supuesto origen bacteriano son una de las diez principales causas de muerte, con un porcentaje de mortalidad del 3.4%. Las enfermedades referidas causan el deceso del 5.2% de los pacientes hombres, el 2.6% de las pacientes mujeres y el 7.4% de los niños atendidos. (INEC, III Censo de Población y Vivienda, 2010)

En busca de nuevas alternativas naturales de inmunización ante los agentes causales de estas enfermedades, se ha recomendado introducir en la alimentación diaria productos con características benéficas como es el caso del yogurt. Este fenómeno se evidencia por el aumento en la producción de yogurt que para el año 2008 es de 3313270 kilos en comparación al año 2000 que fue de 300 kilos. (INEC, 2010)

Con el fin de disminuir la incidencia y prevención de enfermedades entéricas, causadas por bacterias y aprovechando el consumo masivo de yogurt es importante evaluar la capacidad antimicrobiana que poseen los *Lactobacillus* contra las bacterias que se proponen en esta investigación.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Los probióticos tienen diferentes efectos benéficos en el ser humano es así que: modifican la microflora intestinal, influyen directa e indirectamente en el estado de salud a través de la producción de vitaminas y ácidos grasos de cadena corta que colaboran con la degradación de sustancias alimenticias no digeridas, estimulan la respuesta inmune y dan protección frente a microorganismos enteropatógenos. (Wlodzimierz, 2005)

Según, Estrada *et al.* (2005), cerca del 65% de los alimentos que participan en el mercado mundial son productos con probióticos y los *Lactobacillus* son una de las bacterias más requeridas en el mercado. Las cepas mundiales consideradas como probióticos y utilizadas como ingredientes de estos productos son: *L. acidophilus*, *L. lactis*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. helveticus*, *Bifidobacterium*, *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. dentium*, *B. infantis*, *B. longum* entre otros y actualmente, la industria de lácteos es la que más aprovecha los beneficios de estos microorganismos. (Estrada, Gutierrez, & Montoya, 2005)

Los efectos benéficos de los *Lactobacillus* has sido tema de investigación de varios autores alrededor del mundo. Se han realizado investigaciones sobre sus propiedades antagónicas contra ciertos patógenos intestinales y vaginales entre los que se destacan: *Salmonella sp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. rhinoscleromastis*, *Staphylococcus saprophyticus* y *S. aureus*, teniendo sobre cada una de ellas un notable poder inhibitorio.

En función de esta capacidad inhibitoria la medicina busca implementar la bioterapia, que son tratamientos que consisten en utilizar microorganismos probióticos para curar enfermedades bacterianas con el fin de reducir el consumo de antibióticos que causan graves problemas por sus efectos secundarios y desencadenan al final en cuadros clínicos más graves. Además, la nutrición busca implementar en la dieta básica de la población productos beneficiosos de fácil acceso y de bajo costo, que ayuden a prevenir las

enfermedades relacionadas con la flora patógena y obviamente sus implicaciones. (Estrada, Gutierrez, & Montoya, 2005)

2.2. Fundamento teórico

2.2.1. Probióticos

El término probiótico tiene procedencia griega y literalmente significa "a favor de la vida". Fue utilizado por primera vez en 1965 por Lilley y Stillwell para definir a las sustancias procedentes del metabolismo microbiano que promueven el crecimiento de otros microorganismos.

En 1974 la definición anterior fue modificada para ampliarla y abordar no solo a las sustancias de secreción sino también incluir a los organismos que contribuyen al equilibrio intestinal microbiano. (García, 2011)

Posteriormente, la definición se sujetó a varias modificaciones hasta que finalmente la FAO y la OMS proponen la siguiente definición:

“Se define como probióticos a todos los organismos vivos que ingeridos en cantidad adecuada confieren un beneficio saludable al huésped”. (FAO, 2002)

2.2.1.1. Criterios para un probiótico

Un microorganismo debe cumplir con varios requerimientos para poder ser considerado como probiótico, a continuación los mencionaremos:

1. Ser habitante normal del tracto gastrointestinal humano.
2. No ser patógeno, ni tóxico.
3. Tener un tiempo corto de reproducción.
4. Ser estable cuando entra en contacto con el ácido gástrico, las sales biliares, las enzimas y el oxígeno (esto garantiza su supervivencia en el estómago e intestino delgado).
5. Disponer de habilidad para adherirse a la mucosa intestinal.
6. Poseer potencial para colonizar el tracto gastrointestinal humano.
7. Producir sustancias antimicrobianas para normalizar la flora del tracto gastrointestinal (TGI) y suprimir el crecimiento de gérmenes patógenos.

Los seres humanos albergan cantidades elevadas de diversos tipos de microorganismos que están ubicados en la piel, la cavidad oral, el tracto

vaginal y el tracto gastrointestinal. La superficie de la luz intestinal posee alrededor de cien mil millones de bacterias. Por lo tanto, el intestino humano es un ecosistema esencial para que se realice la absorción eficaz de nutrientes y, en general, para el mantenimiento de la salud del organismo.

Se ha estimado que hay más de 400 especies diferentes de bacterias que residen en los seres humanos, la mayoría de estas bacterias no son patógenas y contribuyen al desarrollo normal del hombre, aunque algunas podrían ser patógenas. En un intestino con un funcionamiento óptimo conviven en equilibrio poblaciones de bacterias beneficiosas de los géneros: *Bifidobacterias*, *Lactobacillus* y *E. coli* no patogénicas con otras patógenas como *E. coli* hemolítica, *Clostridium perfringens*, *Campilobacter* y *Listeria*.

Actualmente, se conoce que el desequilibrio de esta microflora puede originar y favorecer el desarrollo de algunas enfermedades; por este motivo, es imprescindible que el balance que debe existir entre los microorganismos sea favorable a las bacterias benéficas. (García, 2011)

2.2.1.2. Mecanismos de acción de los probióticos

No se ha definido con exactitud la manera en la que actúa cada una de las cepas probióticas dentro del organismo humano, pero si se ha podido extrapolar resultados de experimentaciones científicas que suponen abarcar a la mayoría de bacterias benéficas.

Dentro de estos resultados podemos resumir varios mecanismos de acción tales como:

1. Reducción del pH.- inducen la reducción del pH por debajo de 4. Esta reducción se debe a la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como acetatos, butiratos, etc. que al llegar a una concentración adecuada pueden impedir la proliferación de bacterias patógenas y promover el desarrollo de bacterias ácido-tolerantes. Algunos microorganismos nativos, principalmente *Lactobacillus*, producen metabolitos como el peróxido de hidrógeno y ácido láctico que contribuyen a la reducción del pH luminal y del potencial redox; además producen bacteriocinas que inhiben el crecimiento de

las bacterias patógenas y, en ocasiones, mediante la presión baja de oxígeno favorecen el crecimiento de anaerobios y colaboran con el equilibrio benéfico del organismo. (Tormo, 2006)

2. Resistencia a la colonización.- los microorganismos benéficos aumenta la resistencia a la colonización debido a que poseen la capacidad de adherirse a los enterocitos y colonocitos formando así una barrera independiente del sistema inmunológico. En ciertas ocasiones, cepas probióticas, compiten con los microorganismos patógenos por sitios de adhesión al epitelio evitando su nidación y en consecuencia su patogenicidad. (Tormo, 2006)
3. Competencia por nutrientes.- las bacterias benéficas aprovechan de mejor manera los nutrientes y de esta forma los microorganismos patógenos no logran reproducirse y colonizar el organismo humano. (Tormo, 2006)
4. Respuesta inmune.- las bacterias benéficas estimulan la inmunidad innata y adquirida, favoreciendo la producción de la inmunoglobulina A que bloquea el antígeno que ingresa por vía oral, activan macrófagos, estimula las células T helper productoras de citocinas responsables de la inmunidad celular, aumenta la expresión de las mucinas ileocolónicas que recubren el intestino de una capa de moco que resulta eficaz inhibiendo a las bacterias patógenas; además disminuye la producción de la inmunoglobulina E que interviene en cuadros alérgicos. (Tormo, 2006)
5. Secreción de bacteriocinas.- varios géneros de bacterias probióticas segregan antibióticos naturales que tienen un espectro de acción bacteriano muy amplio, entre estas sustancias destacan las lactocinas, las helveticinas, las curvacinas, las nicinas y las bifidocinas. (Tormo, 2006)

2.2.1.3. Principales efectos benéficos atribuidos a bacterias del género *Lactobacillus*

Las funciones de este conjunto de bacterias son variadas y entre ellas podemos mencionar las de fermentar los residuos de los alimentos, estimular y regular el sistema inmunitario y actuar como barrera frente a las bacterias dañinas para el organismo.

Los principales aportes benéficos demostrados de las bacterias ácido lácticas (BAL) al organismo humano son:

- Regulan el funcionamiento intestinal debido a la particularidad de adherirse sobre la pared intestinal impidiendo así el asentamiento de bacterias dañinas. Cuando aumentan excesivamente las bacterias perjudiciales aparece la diarrea y son los *Lactobacillus* quienes actúan como agentes protectores.
- Actúan sobre algunos tipos de alergias y asma mejorando sus síntomas, y aportan beneficiosamente en las patologías dermatológicas como puede ser los eczemas.
- Protegen al organismo de la gripe. El *Lactobacillus casei* tiene un comprobado efecto preventivo sobre el virus de la gripe.
- Refuerzan el sistema inmunológico de personas que están expuestas a altos consumos calóricos, como por ejemplo los atletas.
- Reducen los síntomas de gastritis y úlceras estomacales pues ayudan a inhibir el crecimiento del *Helicobacter pilory*. (Gonzalez, Gomez, & Jimenez, 2003)
- Coadyuvan en el tratamiento del síndrome de intestino irritable. Varios estudios han demostrado que el uso de *Lactobacillus reuteri* reduce la distensión abdominal, la flatulencia y los cólicos desde la primera semana de tratamiento con esta bacteria. (Le Mair, 2008)
- Minimizan los síntomas de la intolerancia a la lactosa pues la transforman de tal manera que el organismo no detecta la concentración de dicho azúcar y no se manifiestan sus molestias. (Le Mair, 2008)
- Disminuyen el riesgo de enterocolitis necrotizantes en recién nacidos prematuros menores a 33 semanas de gestación. (Le Mair, 2008)
- Producen nutrientes importantes para la mucosa intestinal entre ellos la arginina, glutamina y cisteína. Además de que producen vitaminas (algunas del complejo B), antioxidantes, aminos como la histamina, piperidina, tiramina, cadaverina, pirrolina, etc. que son utilizadas por todo el organismo. (Samaniego & Sosa del Castillo, 2002)
- Eliminan toxinas y sustancias innecesarias del lumen. Entre estas sustancias podemos mencionar que especies de *Lactobacillus* producen esteroides a partir del colesterol en el colon y esto ayuda a reducir los niveles de colesterol circundante en el organismo. (Samaniego & Sosa del Castillo, 2002)
- Ayudan a la regulación de funciones intestinales como: absorción de nutrientes, movilidad gastrointestinal y flujo de sangre, mediante la producción

de ácidos grasos de cadena corta, hormonas, enzimas, poliminas y citoquininas y, óxido nitroso. (Samaniego & Sosa del Castillo, 2002)

En base a esta información se ha incorporado a la alimentación diaria productos lácteos ricos en microorganismos benéficos y que aportan eficazmente al estado de salud del consumidor.

2.2.2. Generalidades del género *Lactobacillus*

2.2.2.1. Género *Lactobacillus*

Caracteres morfológicos

El género *Lactobacillus* se caracteriza por ser células bacilares largas que con frecuencia pueden observarse como bacilos cortos o coco-bacilos. Estos bacilos se presentan comúnmente formando cadenas y en general son inmóviles, pero cuando tienen motilidad es por la presencia de flagelación peritrica. Son Gram positivos, no esporulados y presentan un metabolismo generalmente fermentativo.

Las colonias en medios sólidos generalmente son pequeñas (de 2 a 5 mm), convexas, con márgenes enteros, opacas y sin pigmentos. (Samaniego & Sosa del Castillo, 2002)

Características bioquímicas

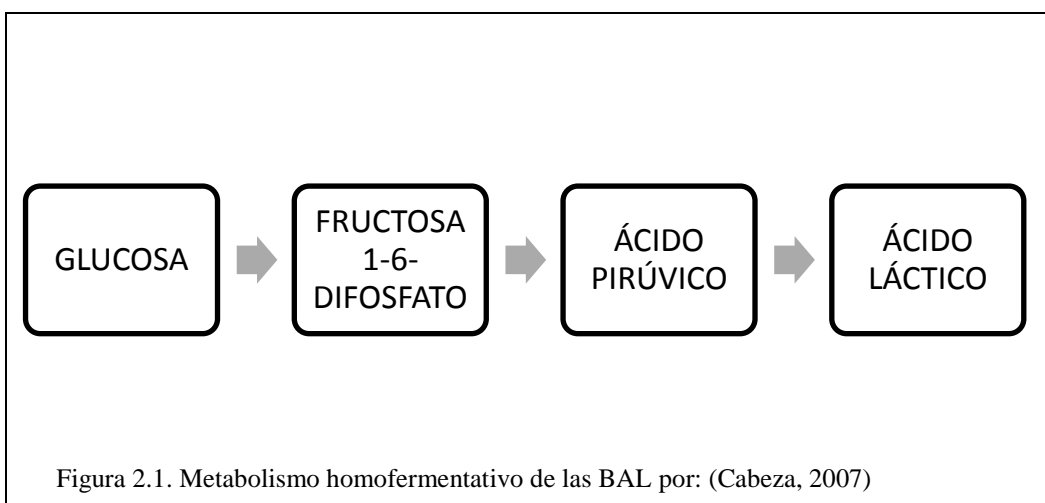
Presentan las siguientes reacciones bioquímicas:

- Reducción de nitratos : negativo
- Licuación de gelatina: negativo
- Consumo de caseína: negativo
- Producción de indol: negativo
- Producción de ácido sulfhídrico: negativo
- Catalasa: negativo
- Citocromo: negativo

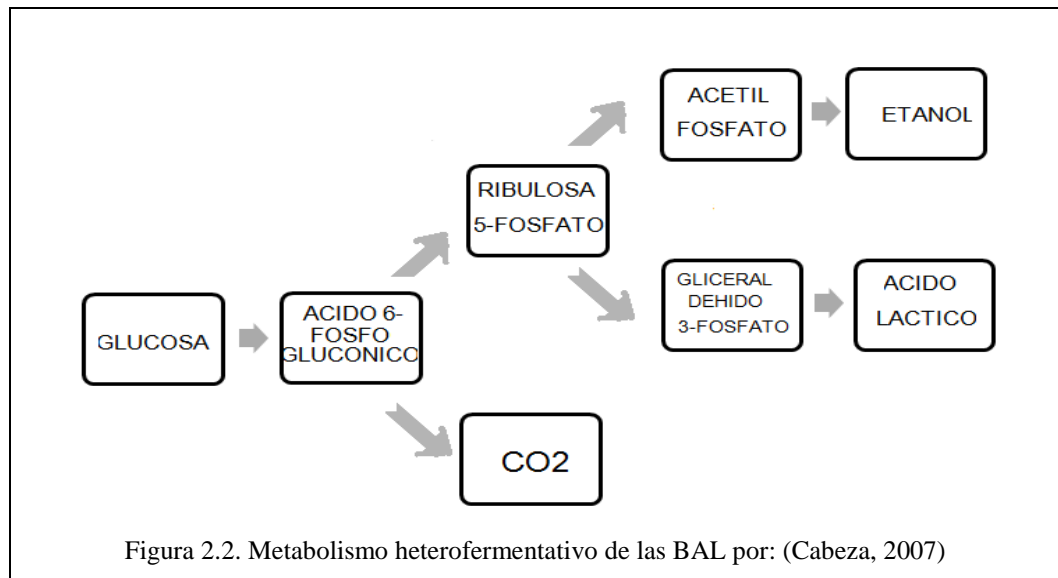
Presentan particularidades para cada especie respecto a los requerimientos nutricionales complejos para los aminoácidos, péptidos, derivados de ácidos nucleicos, vitaminas, sales, ácidos grasos o ésteres de ácidos grasos y carbohidratos fermentables. (Samaniego & Sosa del Castillo, 2002)

Condiciones ecológicas

- pH.- crecen bien en medios ligeramente ácidos, con pH inicial de 6,4 - 4,5 y con un óptimo de desarrollo entre 5,5 y 6,2. Su crecimiento cesa cuando el pH alcanza valores desde 4 hasta 3,6 en función de cada especie y disminuye notablemente en medios neutros o ligeramente alcalinos. (Samaniego & Sosa del Castillo, 2002)
- Necesidades de Oxígeno.- son principalmente aerotolerantes; su crecimiento óptimo se alcanza bajo condiciones microaerofílicas o anaeróbicas y se conoce que un incremento de la concentración de dióxido de carbono estimula el crecimiento. (Samaniego & Sosa del Castillo, 2002)
- Temperatura de crecimiento.- la mayoría de bacterias son mesófilas, aunque su rango de temperaturas para el crecimiento oscila entre 2 y 53°C, algunos crecen por debajo de 15°C y hay cepas que crecen por debajo de 5°C. Otros crecen a temperaturas bajas, cercanas al punto de congelación (por ejemplo, los que habitan en carnes y pescados congelados). Los llamados *Lactobacillus* “termófilos” pueden tener un límite superior de temperatura de 55°C y no crecen por debajo de 15°C. Aún no se conocen los verdaderos *Lactobacillus* termófilos que crezcan por encima de 55°C. (Samaniego & Sosa del Castillo, 2002)
- Metabolismo.- el metabolismo fermentativo lo realizan por dos vías:
 - 1) Las bacterias homofermentativas producen ácido láctico mediante la vía Embden-Meyer (glucólisis).



- 2) Las bacterias heterofermentativas además de ácido láctico, producen etanol, acetato y dióxido de carbono (CO₂) por la vía de la hexosa mono-fosfato o de la pentosa.



En condiciones aerobias, la mayoría de las cepas re-oxidan el NADH₂ utilizando el O₂ como aceptor final de electrones, de modo que el Acetil-CoA no es, o al menos no es completamente reducido a etanol. De esta manera, se forma ATP adicional por fosforilación a nivel de sustrato, así como proporciones variables de ácido acético y etanol, en dependencia del suministro de oxígeno.

- Especies de *Lactobacillus*.- el género *Lactobacillus* posee 44 especies distribuidas en tres grupos. Algunas de estas a su vez presentan subespecies como en el caso de:

Lactobacillus delbrueckii (con tres subespecies: *bulgaricus*, *lactis* y *delbrueckii*).

Lactobacillus salivarius (con dos subespecies: *salivarius* y *salicinus*).

Lactobacillus casei (con cuatro subespecies: *casei*, *pseudopantarum*, *rhamnosus* y *tolerans*).

Lactobacillus coryniformis (con dos subespecies: *coryniformis* y *torquens*).

Los tres grupos en los que se les clasifica son:

Grupo I: Lactobacilos homofermentativos obligados.

Fermentan las hexosas exclusivamente a ácido láctico por la vía Embden-Meyerhoff; no fermentan las pentosas ni el gluconato. Entre estas especies y subespecies se encuentran: *L. delbrueckii subsp. delbrueckii*, *L. delbrueckii subsp. lactis*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. amylophilus*, *L. amylovorus*, *L. animalis*, *L. crispatus*, *L. farciminis*, *L. gasseri*, *L. helveticus*, *L. jensenii*, *L. ruminis*, *L. salivarius*, *L. sharpeae*, *L. vitulinus* y *L. yamanashiensis*. (Samaniego & Sosa del Castillo, 2002)

Grupo II: Lactobacilos heterofermentativos facultativos.

Fermentan las hexosas casi exclusivamente a ácido láctico pero también pueden producir ácido acético, etanol y ácido fórmico bajo limitantes de glucosa. También pueden fermentar las pentosas hasta ácido láctico y ácido acético por la vía de fosfocetolasa inducible. Entre estas especies y subespecies se encuentran: *L. agilis*, *L. alimentarius*, *L. bavaricus*, *L. casei subsp. casei*, *L. casei subsp. pseudopiantarum*, *L. casei subsp. rhamnosus*, *L. casei subsp. tolerans*, *L. coryniformis subsp. coryniformis*, *L. coryniformis subsp. torquens*, *L. curvatus*, *L. homohiochii*, *L. maltaromicus*, *L. murinus*, *L. plantarum* y *L. sake*. (Samaniego & Sosa del Castillo, 2002)

Grupo III: Lactobacilos heterofermentativos obligados.

Fermentan las hexosas a ácido láctico, ácido acético y dióxido de carbono, además fermentan las pentosas hasta ácido láctico y ácido acético. En general, ambas vías involucran a la fosfocetolasa. Entre estas especies y subespecies se encuentran: *L. bifementans*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. collinoides*, *L. confusus*, *Lactobacillus divergens*, *L. fermentum*, *L. fructivorans*, *L. fructosus*, *L. halotolerans*, *L. hilgardii*, *L. kandleri*, *L. kefir*, *L. minor*, *L. reuteri*, *L. sanfrancisco*, *L. vaccinostercus* y *L. viridescens*. (Samaniego & Sosa del Castillo, 2002)

2.2.3. Bacteriocinas

Las bacteriocinas han sido definidas como péptidos biológicamente activos, que tienen propiedades bactericidas contra otras especies causantes de enfermedades.

Las bacteriocinas, son productos del metabolismo bacteriano, principalmente, de algunas BAL, que poseen características antimicrobianas.

Se ha comprobado que el espectro de acción de las bacteriocinas aisladas de la mayoría de cepas lácticas, abarca bacterias Gram positivas y algunas bacterias Gram negativas. (Aguavil, 2012)

2.2.3.1. Mecanismos de acción de las bacteriocinas

Las bacteriocinas son sustancias proteicas heterogéneas formadas por una diversidad de péptidos compuestos por más de 60 aminoácidos que pueden ser péptidos de moléculas elongadas o péptidos de moléculas globulares con un rango de peso molecular muy variado. Estas bacteriocinas pueden ser clasificadas en tres clases:

Clase I: lantibióticas, con poca estabilidad al calor, formadas por péptidos poli cíclicos (<5KDa) con aminoácidos modificados.

Clase II: son pequeñas (<10 KDa) no – lantibióticas y estables al calor.

Clase III: son moléculas grandes (>10 KDa) e inestables al calor.

La diferencia en el peso molecular nos refiere que cada bacteriocina es diferente y que su uso como preservante, depende de la flora alterante o patógena que se desea controlar.

El mecanismo de muchas bacteriocinas consiste en desestabilizar la membrana citoplasmática formando poros transitorios que alteran la fuerza electromotriz de la célula debido a la interacción con polímeros aniónicos que constituyen la pared celular.

Este mecanismo de producción de bacteriocinas es muy complejo y sincronizado, de tal forma que para proteger a la bacteria productora de la

toxicidad de estos compuestos, se codifica una proteína de inmunidad en el mismo operón que origina la bacteriocina. Este mecanismo de inmunidad le permite a la célula seguir reproduciéndose y liberar el compuesto biopreservante. (Rojas & Vargas, 2007)

Es importante recordar que la expresión máxima de las bacteriocinas se da en la fase logarítmica temprana del crecimiento celular, por lo que la efectividad de la acción antimicrobiana dependerá de las condiciones apropiadas que se dé al cultivo iniciador para que realice su metabolismo de manera completa y con la mayor velocidad.

Se debe mencionar que existe una resistencia de los microorganismos a las bacteriocinas que, mayoritariamente, depende de la interacción del citoplasma con estas sustancias; esta interacción depende de los fosfolípidos de la membrana celular, de su composición y su distribución que determinará la formación del poro y su efecto en la célula. Esta interacción también explica el por qué una célula tiende a presentar resistencia al ser expuesta a la misma bacteriocina frecuentemente, por lo que es importante estudiar la posibilidad de realizar mezcla de bacteriocinas con el fin de reducir esta resistencia y aumentar el espectro de acción. (Rojas & Vargas, 2007)

Otro factor importante en el efecto de las bacteriocinas es la presencia de iones como magnesio (Mg^{+2}) y calcio (Ca^{+2}), los cuales neutralizan la carga negativa de los fosfolípidos y vuelven rígida a la membrana citoplasmática evitando la acción antimicrobiana de la bacteriocina.

Se ha afirmado que el efecto antimicrobiano de las bacteriocinas está consignado hacia las bacterias Gram-positivas, en función de la composición de su membrana externa. Dicha membrana en las bacterias Gram-Negativas, contiene liposacáridos y no fosfolípidos, esta diferencia la vuelve permeable a macromoléculas y solutos hidrofóbicos como las bacteriocinas haciendo a la bacteria más resistente al efecto antimicrobiano aunque se ha encontrado que algunas bacteriocinas de las bacterias ácido-lácticas son capaces de inhibir a bacterias Gram-negativas. (Rojas & Vargas, 2007)

La actividad de las bacteriocinas en alimentos depende de varios factores como: composición y química del alimento, estabilidad de la bacteriocina, pH, condiciones de almacenamiento, etc., por ello es muy importante identificar a

la bacteriocina que realmente puede ejercer un efecto preservante en un alimento y las condiciones bajo las cuales puede tener actividad antimicrobiana. (Rojas & Vargas, 2007)

2.2.3.2. Bacteriocinas producidas por cepas del género *Lactobacillus*

Los *Lactobacillus* producen varios tipos de bacteriocinas, según se muestra en la tabla adjunta. Algunas bacteriocinas proceden de *Lactobacillus* de origen lácteo y otras de sustratos diferentes como carne, derivados cárnicos, productos vegetales, intestino de niños lactantes, etc. cuyo espectro antimicrobiano varía significativamente.

Tabla 2.1 Bacteriocinas producidas por bacterias del género *Lactobacillus*.

Bacteriocina	Productor	Tamaño	Características bioquímicas
Bac	<i>L. fermentis</i>	ND	Proteína – lipocarbohidrato
Lactocina 27	<i>L. helveticus</i> 27	>2000000	Proteína – lipopolisacárido
Helveticina J	<i>L. helveticus</i>	37000	334 aminoácidos
Lactacina B	<i>L. acidophilus</i>	6000 – 6500	ND
Lactacina F	<i>L. acidophilus</i>	6300	57 aminoácidos
Plantaricina A	<i>L. plantarum</i>	8000	ND
Plantaricina S	<i>L. plantarum</i>	ND	ND
Sakacina A	<i>L. sake</i> Lb706	ND	ND
Lactocina S	<i>L. sake</i> L45	3771	Lantibióticos, 37 aminoácidos
Sakacina M	<i>L. sake</i> 148	4467	ND
Caseicina 80	<i>L. casei</i>	40000 – 42000	ND
Brevicina 37	<i>L. brevis</i>	ND	ND

Nota: Adaptado de: (Sociedad Española, 1993)

El modo de acción de las bacteriocinas es complejo y depende de su naturaleza estructural para ejercer su efecto. La gran mayoría de bacteriocinas son péptidos que por lo general actúan destruyendo la integridad de la membrana citoplasmática a través de la formación de poros, lo que provoca la salida de compuestos pequeños o altera la fuerza motriz de protones necesaria para la producción de energía y síntesis de proteínas o ácido nucleicos dando como resultado la muerte celular. (Gonzalez, Gomez, & Jimenez, 2003)

2.2.4. Yogurt

La utilidad terapéutica del yogurt está íntimamente relacionada con las cepas bacterianas que contiene y el número de células viables que existen en el momento de su ingestión.

La dosis mínima de bacterias viables necesaria en un medio lácteo es 10^8 por ración ingerida para garantizar su eficiencia terapéutica. Se ha demostrado que la administración de 10^8 bacterias en una base de leche ingerida, producen una mayor recuperación fecal que 10^{10} de organismos administrados en polvo liofilizado.

El yogurt actúa como medio de transporte para las bacterias probióticas, debido a que mejora la supervivencia de las bacterias a través del tracto gastrointestinal (TGI) y permite alcanzar números similares de microorganismos viables a los que se administra en forma de cápsulas, comprimidos o polvo diluido en bebidas no lácteas para el tratamiento de trastornos intestinales.

Otra ventaja importante del yogurt es que cada porción de 100 g de yogur contiene aproximadamente de 3.1 a 3.5 g de lactosa, cantidad que está por debajo del umbral de las personas con intolerancia a la lactosa. En opinión de algunos expertos, los individuos que padecen intolerancia a la lactosa podrían consumir esta cantidad mínima de yogur sin que sufriesen efectos perjudiciales. (García, Probióticos y Prebióticos. Aliados de la Salud , 2008)

2.2.5. Afecciones gastrointestinales

Presentan como sintomatología común diarreas, definiéndose a las mismas como el aumento de la frecuencia, volumen y/o fluidez de las heces por una causa infecciosa, malas absorciones alimenticias, factores endócrinos, toxicológicos entre otros.

Las diarreas infecciosas son uno de los problemas más graves de salud pues causa la muerte de adultos y sobre todo de niños.

El mecanismo infeccioso patogénico de la diarrea puede ser de dos tipos: invasivo por colonización intestinal y, toxigénico causado por secreciones bacterianas de microorganismos patógenos. Los dos tipos presentan sintomatologías diferentes que en algunos casos permiten diferenciarlos pero

con mayor frecuencia se presentan juntos de tal forma que es muy difícil establecer el tipo. (Sociedad Española de Microbiología, 1993)

Existen varios factores que favorecen la producción de las diarreas, unos que implican a los microorganismos causales y otros relacionados con el estado inmunológico del huésped.

Cuando hablamos del microorganismo causal es muy importante tener en cuenta su dosis infectante, capacidad invasiva y de colonización, la movilidad, y la producción de toxinas para saber la gravedad de la diarrea provocada.

En cuanto al huésped es prudente determinar si pertenece a un grupo de riesgo (niños y ancianos), el estado inmunológico, alteraciones de secreciones gástricas (gastritis), estado de la flora nativa, etc.

Las afecciones entéricas presentan diferentes grados de peligrosidad de acuerdo a cada uno de los agentes causales y del tipo de diarrea que producen. (Garcia, Paredes, & Fernandez)

2.2.5.1. Salmonelosis

El género *Salmonella* es el agente causal de diferentes infecciones intestinales humanas las cuales pueden presentarse con fiebre entérica debido a la invasividad de la bacteria. (Calva, 2003)

El reservorio de *Salmonella* lo constituyen los animales de sangre caliente principalmente las aves. Se transmite al hombre a partir del agua y varios alimentos contaminados sobre todo huevos y carne de animales contaminados con heces o restos intestinales. (Pares & Juarez, 2002)

La dosis infectante es de 10000 bacterias. Se caracteriza por un período de incubación de 12 a 48 horas. Su patogenicidad se da por la invasión de la mucosa del intestino delgado con la consiguiente lesión del epitelio, junto a la producción de una enterotoxina que afecta al colon. Las diarreas duran entre 2 y 6 días con deposiciones fétidas de 8 a 15 diarias más o menos acuosas, acompañadas de náuseas, vómitos, cefaleas, dolor abdominal, en algunos casos deshidratación grave que puede causar una insuficiencia renal aguda. (Garcia, Paredes, & Fernandez)

Se ha observado que en individuos inmunodeprimidos la diarrea se promueve por la baja producción de ácido clorhídrico lo que agrava el cuadro clínico y puede provocar la muerte.

2.2.5.2. Fiebre Tifoidea

Es una infección específica, producida por *Salmonella typhi*, que se transmite de ser humano a ser humano por ingesta de agua y alimentos contaminados con heces.

El período de incubación para la fiebre tifoidea es variable, con un promedio de 14 días, al inicio de la enfermedad se encuentran bacilos en la sangre, heces y orina del individuo enfermo.

Los síntomas de esta enfermedad incluyen: malestar general que se presenta en forma gradual, cefalea, faringitis, tos y finalmente diarrea. Existe además un incremento en la temperatura corporal, que asciende lentamente hasta un grado máximo para luego descender paulatinamente a su estado normal. Se presentan también manchas rosadas, bradicardia relativa, esplenomegalia, distensión abdominal e hipertensión. (Koneman, Stephen, & UR, 2008)

El reservorio de esta enfermedad es el ser humano tanto enfermo como portador.

2.2.5.3. Infecciones intestinales provocadas por *Escherichia coli* comensal

Escherichia coli es una de las bacterias que forman parte de la flora normal del intestino humano. Estos comensales bacterianos son útiles, no sólo en la digestión y descomposición del alimento, sino también en la protección contra organismos nocivos que pueden introducirse en el tracto gastrointestinal a través de alimentos y agua.

Una población bacteriana intestinal saludable compite contra organismos patógenos por alimento y colonización del intestino.

El término comensal no exime a estos agentes como causales de una infección intestinal. De hecho algunos comensales pueden causar infección si las defensas del huésped se encuentran deprimidas, debido a que estos microorganismos poseen factores de virulencia.

Cuando se refiere a las infecciones por *E. coli* cabe destacar que son causadas por la colonización del intestino delgado y su acción es citotóxica pues destruye las microvellosidades intestinales y se adhieren a la superficie luminal lesionada. (Garcia, Paredes, & Fernandez)

3. METODOLOGÍA

3.1. Tipo de Investigación

La investigación es de tipo experimental, se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador.

3.2. Muestreo

3.2.1. Origen de las muestras de yogurt artesanal

En el mercado de Santa Clara (Quito), se adquirieron dos yogures artesanales, que ha decir de sus expendedoras son los de mayor comercialización y cuyas marcas fueron:

- Yogurt Florella (sabor a durazno)
- Yogurt San Luis (sabor a mora)

El transporte de las muestras al laboratorio de microbiología, se realizó guardando la cadena frío.

3.2.2. Origen de las muestras de yogurt industrial

Las muestras de yogurt industrial se obtuvieron en base a los siguientes criterios:

- Yogures que declaren en su etiqueta como probiótico. Ej.: Yogurt Tony, y
- Yogures cuyo nivel de comercialización sea alto. Ej.: Yogurt Alpina (dato proporcionado por INEC).

Las muestras fueron adquiridas en el supermercado Santa María, ubicado en el sector de la Ofelia, en la ciudad de Quito y transportadas hacia el laboratorio de microbiología, de tal forma que mantengan la cadena de frío.

3.2.3. Características del sitio experimental

Tabla 3.1. Laboratorio de Microbiología de Alimentos, Facultad de Ciencias Químicas.

UBICACIÓN		SITUACION GEOGRAFICA	
Provincia:	Pichicha	Temperatura:	26° promedio
Cantón:	Quito	Humedad relativa:	44%
Parroquia:	Belisario Quevedo	Clima:	Templado cálido

Nota: Adaptado de: (Rosero, 2011)

3.3. Fases experimentales

3.3.1. Primera Fase: aislamiento de *Lactobacillus* presentes en yogurt y determinación de la capacidad antimicrobiana.

3.3.1.1. Métodos microbiológicos de aislamiento

3.3.1.1.1. Aislamiento e Identificación de *Salmonella sp* de carne

El aislamiento de *Salmonella sp* se realizó en base a la metodología indicada en la norma ISO 6579

3.3.1.1.2. Aislamiento e Identificación de *Escherichia coli* de chochos

El aislamiento de *Escherichia coli* se realizó siguiendo los procedimientos mencionados en la norma ISO 7251

3.3.1.1.3. Aislamiento e Identificación de *Lactobacillus sp.* de yogurt

El aislamiento de *Lactobacillus sp.* se realizó según el procedimiento indicado en el manual de Microbiología de Merck.

3.3.1.2. Métodos de activación de cepas ATCC

3.3.1.2.1. Activación de *Salmonella typhi* ATCC 14028

Las cepas ATCC 14028 de *Salmonella typhi* fueron activadas siguiendo los procedimientos mencionados en el Instructivo para la elaboración de materiales de referencia del Laboratorio de Oferta de Servicios y Productos de Microbiología de Alimentos (OSP), de

la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador.

3.3.1.2.2. Activación de *Escherichia coli* ATCC 11775

La activación de la cepa ATCC 11775 de *Escherichia coli*, se realizó siguiendo los mismos lineamientos del instructivo del OSP de Microbiología de Alimentos.

3.3.1.3. Métodos de evaluación de antimicrobianos

3.3.1.3.1. Elección del medio de cultivo adecuado para la evaluación de la inhibición bacteriana.

La elección del medio de cultivo adecuado para el crecimiento tanto de los *Lactobacillus* como de las bacterias entéricas a evaluar, se llevó a cabo en base al Método Ecométrico.

El método econométrico implica la siembra en estría del microorganismo, en cada uno de los cuatro sectores en los que se divide a la caja petri con el medio de cultivo a evaluar, realizando en cada cuadrante 5 líneas de siembra y una línea central, de manera consecutiva, sin volver a cargar el asa y sin picar en el agar.

Para la elección del medio de cultivo se sembró *S. typhi* ATCC 14028 y *S. sp.*, en agar MRS (Man, Rogosa y Sharpe), agar Sangre y en un medio específico que sirvió de control agar XLD (Xilosa, Lisina, Desoxicolato). Este procedimiento se realizó por duplicado para cada uno de los medios y para cada bacteria.

De la misma forma se realizó la siembra de *E. coli* ATCC 11775 y *E. coli* en agar MRS, agar Sangre y como medio de control se utilizó agar EMB (Eosina- Azul de Metileno).

Los *Lactobacillus* fueron sembrados en los mismos medios que los microorganismos entéricos (agar MRS y agar Sangre) y su medio de control fue el mismo agar MRS. (Mossel, B, & Strujik, 2006)

3.3.1.3.2. Método de inhibición en caldo

La inhibición en caldo se llevó a cabo bajo los procedimientos señalados en la técnica de Microdilución en Caldo para probar antimicrobianos.

Para llegar a determinar la capacidad de inhibición, se procedió a preparar diluciones 10^8 de cada bacteria láctica aislada (utilizando el estándar Mc. Farland) y de la bacteria de control (*Lactobacillus acidophilus*) a las cuales se realizó una micro filtración para obtener la solución libre de células bacterianas.

Posteriormente se colocaron 16 tubos con 9mL de caldo MRS y se les inoculó concentraciones seriadas de la suspensión metabólica del *Lactobacillus* L1 a evaluar. Las concentraciones fueron: 0, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260 y 280 ppm; luego se añadió 1mL de una suspensión 10^8 (comparada con estándar Mc Farland) de *S. typhi* ATCC 14028 y se los incubo a 37° C durante 24 horas.

De igual forma se repitió la serie de concentraciones de la suspensión bacteriana del *Lactobacillus* L1 para evaluar el crecimiento de *S. sp.*, *E. coli* ATCC 11775 y *E. coli* inoculando bajo el mismo procedimiento, 1mL del microorganismo e incubando durante 24 horas a 37° C.

Esta metodología aplicada a la suspensión metabólica del *Lactobacillus* L1 se repitió exactamente para la suspensión metabólica del *Lactobacillus* L2 y del *Lactobacillus* de control. (Koneman & al., 2006)

3.3.1.3.3. Método de inhibición en agar

La inhibición bacteriana se realizó mediante la metodología de Difusión en Agar para evaluar antimicrobianos.

La determinación de la zona de inhibición se realizó mediante la técnica de siembra en franja. Para esto se procedió a preparar 3 placas de agar MRS a las cuales se les realizó una sección central de

aproximadamente 3 cm de ancho, en la cual se inoculó la suspensión bacteriana del *Lactobacillus* L1 por la técnica de hisopado y se incubó durante 72 horas a 35°C en condiciones de anaerobiosis.

Posterior al crecimiento de los *Lactobacillus*, se procedió a remover las células presentes en la sección central realizada a las cajas, con la ayuda de un bisturí estéril y prepararlas para la siembra de los microorganismos a inhibir.

A continuación se tomó azadas de una suspensión de *S. typhi* y se realizaron 4 siembras en líneas rectas perpendiculares a cada lado de la sección central con una separación de 3mm y se incubaron a 37°C durante 24 horas en condiciones de aerobiosis.

Este procedimiento se realizó para evaluar a la inhibición de *S. sp*, *E. coli* ATCC 1177 y *E. coli*.

Toda la técnica anterior se repitió exactamente para la suspensión bacteriana del *Lactobacillus* L2 y del *Lactobacillus* de control. (Koneman & al., 2006)

3.3.2. Segunda Fase: análisis de la influencia del pH sobre la capacidad antimicrobiana de la suspensión metabólica.

3.3.3. Tercera Fase: estudio de la estabilidad de la suspensión metabólica en función de la temperatura y tiempo de almacenamiento.

3.4. Factores en estudio

Los factores en estudio para la segunda y tercera fase experimental fueron tres: pH, temperatura de almacenamiento y tiempo.

FACTOR pH

El objetivo de variar el pH de la suspensión bacteriana es verificar si a pesar de dicha variación, la actividad antimicrobiana permanece estable y registra los mismos patrones de inhibición.

FACTORES TEMPERATURA Y TIEMPO DE ALMACENAMIENTO

La temperatura de almacenamiento se evaluó con el fin de determinar la vida útil y las mejores condiciones de conservación del extracto metabólico de cada cepa en análisis. Para ello era necesario medir la inhibición producida con respecto al tiempo de almacenamiento.

3.5. Tratamientos

Los tratamientos aplicados a cada extracto metabólico se resumen de la siguiente manera, en función de los factores en estudio antes mencionados. Para el caso del pH, se analiza extracto metabólico de la cepa de *Lactobacillus*, el pH y la cepa patógena a inhibir.

La descripción para la variación de este parámetro se describe en la tabla a continuación:

Tabla 3.2 Tratamientos para la determinación de la influencia de los cambios de pH

Cepas de <i>Lactobacillus</i>	Tratamientos
<i>Lactobacillus 1</i>	L1P1SA
	L1P2SA
	L1P3SA
	L1P1S
	L1P2S
	L1P3S
	L1P1EA
	L1P2EA
	L1P3EA
	L1P1E
	L1P2E
	L1P3E
	L2P1SA
	L2P2SA
	L2P3SA
<i>Lactobacillus 2</i>	L2P1S
	L2P2S
	L2P3S
	L2P1EA
	L2P2EA
	L2P3EA
	L2P1E
	L2P2E
	L2P3E
	LnP1SA
	LnP2SA
	LnP3SA
	LnP1S
	LnP2S
	LnP3S
<i>Lactobacillus n</i>	LnP1EA
	LnP2EA
	LnP3EA
	LnP1E
	LnP2E
	LnP3E

Donde:

- **L:** extracto metabólico de cada una de las cepas de *Lactobacillus* aislados
- **P:** variación del factor pH
- **SA:** *Salmonella typhi* ATCC 14028
- **S:** *Salmonella* sp.
- **EA:** *Escherichia coli* ATCC 11775
- **E:** *Escherichia coli*

Para el caso de la temperatura de almacenamiento, se analiza de manera similar: el extracto metabólico de la cepa de *Lactobacillus*, la temperatura de almacenamiento y el tiempo de almacenamiento (0, 7, 14, 21 y 28 días). En estas determinaciones se utiliza una sola cepa entérica para determinar la inhibición. (*Salmonella typhi*).

Tabla 3.3. Tratamientos para determinar la influencia de los cambios de T vs t.

Cepas de <i>Lactobacillus</i>	Tratamientos
<i>Lactobacillus 1</i>	L1T1t1
	L1T1t2
	L1T1t3
	L1T1t4
	L1T1t5
	L1T2t1
	L1T2t2
	L1T2t3
	L1T2t4
	L1T2t5
	L1T3t1
	L1T3t2
	L1T3t3
	L1T3t4
	L1T3t5
<i>Lactobacillus 2</i>	L2T1t1
	L2T1t2
	L2T1t3
	L2T1t4
	L2T1t5
	L2T2t1
	L2T2t2
	L2T2t3
	L2T2t4
	L2T2t5
	L2T3t1
	L2T3t2

Tabla 3.3. Tratamientos para determinar la influencia de los cambios de T vs t.
(continuación)

<i>Lactobacillus n</i>	L2T3t3
	L2T3t4
	L2T3t5
	LnT1t1
	LnT1t2
	LnT1t3
	LnT1t4
	LnT1t5
	LnT2t1
	LnT2t2
	LnT2t3
	LnT2t4
	LnT2t5
	LnT3t1
	LnT3t2
	LnT3t3
	LnT3t4
	LnT3t5

Donde:

- **L:** extracto metabólico de cada cepa de *Lactobacillus* aislado
- **T:** variaciones del factor temperatura de almacenamiento
- **t:** variaciones del factor tiempo.

3.6. Diseño experimental

El diseño experimental tiene lugar en las dos últimas fases experimentales. A mencionadas fases se les aplica un diseño factorial AxBxC, que permite definir con exactitud las condiciones de pH, temperatura de almacenamiento y tiempo que debe mantener el extracto metabólico para optimizar su capacidad antimicrobiana.

El diseño se aplica de la siguiente forma:

Tabla 3.4. Factores en estudio y sus niveles para la segunda fase

FACTORES	NIVELES				
Cepa de <i>Lactobacillus</i> aislada	A	L1	L2	Ln	
pH	B	P1	P2	P3	
Cepa a inhibir	C	SA	S	EA	E

Tabla 3.5. Factores en estudio y sus niveles para la tercera fase

FACTORES	NIVELES					
Cepa de <i>Lactobacillus</i> aislada	A	L1	L2	Ln	-	-
Temperatura de almacenamiento	B	T1	T2	T3	-	-
Tiempo	C	t1	t2	t3	t4	t5

El análisis de varianza de las dos fases experimentales se realiza de la siguiente forma:

Tabla 3.6. Esquema del análisis de varianza

Fuente de variación	Grados de Libertad
Total	ABCN-1
Repeticiones	N-1
Tratamientos	ABC-1
Factor A	A-1
Factor B	B-1
Factor C	C-1
Interacción AB	(A-1)(B-1)
Interacción AC	(A-1)(C-1)
Interacción BC	(B-1)(C-1)
Interacción ABC	(A-1)(B-1)(C-1)
Error Experimental	(ABC-1)(N-1)

Donde:

- A: representa el número de niveles del factor A
- B: representa el número de niveles del factor B
- C: representa el número de niveles del factor C
- N: representa el número de repeticiones de cada tratamiento.

3.6.1. Análisis estadístico

El análisis estadístico aplicado a la variable dependiente (inhibición bacteriana), se describe a continuación:

- Análisis de varianza.
- Coeficiente de Variación expresado en porcentaje.
- Prueba de Duncan al 5% para establecer interacciones significativas entre tratamientos.

4. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1. Aislamiento e identificación microbiológica

4.1.1. Aislamiento e identificación de *Salmonella* sp. de carne

Enriquecimiento en Caldo Rappaport.

Fundamento del Caldo Rappaport Vassiliadis: el verde de malaquita y el cloruro de magnesio inhiben notablemente el crecimiento de la flora intestinal normal, en tanto que la mayoría de las *Salmonellas* se multiplican sin obstáculos. Por regla general, únicamente *Salmonella typhi* y *Shigella* resultan inhibidas también por el verde de malaquita. Por este motivo no es adecuado este medio de cultivo para el enriquecimiento de estos agentes patógenos.

RESULTADOS DESPUES DE LA INOCULACION

<i>Crecimiento</i>	Positivo
<i>Cambios en el medio</i>	Cambio de coloración (de azul a celeste)
<i>Posibles bacterias aisladas</i>	<i>Salmonella enteritidis</i> (MERCK, 2005)

Enriquecimiento en Caldo Selenito Cistina

Fundamento del Caldo Selenito Cistina: el selenito inhibe el crecimiento de bacterias coliformes y *Enterococcus* en las primeras 6 a 12 horas siguientes al inicio de la incubación. Después el efecto inhibidor disminuye lentamente. Por el contrario, *Salmonella*, *Proteus* y *Pseudomonas* no son inhibidas.

RESULTADOS DESPUES DE LA INOCULACION

<i>Crecimiento</i>	Positivo
<i>Cambios en el medio</i>	Cambio de coloración (de azul a celeste)
<i>Posibles bacterias aisladas</i>	<i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Salmonella typhimurium</i>

Nota: (MERCK, 2005)

Aislamiento en agar XLD

Fundamento del Agar XLD: la degradación a ácido de la xilosa, lactasa y sacarosa produce un viraje a amarillo del rojo de fenol. El tiosulfato y la sal de hierro III revelan la información del ácido sulfhídrico por la precipitación del sulfuro de hierro negro en las colonias. Las bacterias que descarboxilan la lisina, produciendo cadaverina, se reconocen por la presencia de un color rojo purpúreo, debido al aumento del pH, alrededor de sus colonias.

RESULTADOS DESPUES DE LA INOCULACION

Forma	Redonda
Tamaño	Pequeña
Borde	Entero
Elevación	Convexa
Color	Rojas con centros negros
Consistencia	Creмосa
Afinidad tintorial	Gram (-)
Estructura	Bacilar
Posibles bacterias aisladas	<i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Proteus mirabilis</i>

Nota: (MERCK, 2005)

Identificación bioquímica de las colonias aisladas.

Prueba bioquímica	Resultado
Lactosa	+
Ácido Sulfhídrico	+
Fermentación de glucosa	+
Citrato	+
Urea	-
Indol	-
Gelatina	+/-

Bacteria aislada: *Salmonella* sp. (Bergey, 1994)

4.1.2. Aislamiento e identificación de *Escherichia coli* de chochos

Enriquecimiento Selectivo en Caldo Lauril Sulfato

Fundamento del Caldo Lauril Sulfato: debido a su elevada calidad nutritiva y al tampón de fosfatos que contiene este medio de cultivo se garantiza el rápido crecimiento y la intensa formación de gas, incluso en el caso de coliformes que fermentan lentamente la lactosa. La formación de gas puede detectarse con campanas de fermentación. El contenido en Lauril sulfato inhibe notablemente el crecimiento de la flora acompañante indeseable.

RESULTADOS DESPUES DE LA INOCULACION

<i>Crecimiento</i>	Positivo
<i>Cambios en el medio</i>	Turbidez
<i>Presencia de gas</i>	Positiva
<i>Posibles bacterias aisladas</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Citrobacter freundii</i>

Nota: (MERCK, 2005)

Enriquecimiento Selectivo de *Escherichia coli*. en Caldo EC

Fundamento: en tanto que el contenido de lactosa favorece a las bacterias Lac (+), especialmente coliformes y *Escherichia coli* las sales biliares inhiben notablemente el crecimiento de gérmenes Gram (+) o de especies microbianas no adaptadas al medio ambiente intestinal. Los gérmenes Lac (+) consumen lactosa con producción de gas.

RESULTADOS DESPUES DE LA INOCULACION

<i>Crecimiento</i>	Positivo
<i>Cambios en el medio</i>	Cambio de coloración (de azul a celeste)
<i>Presencia de gas</i>	Positiva
<i>Posibles bacterias aisladas</i>	<i>Escherichia coli</i>

Nota: (MERCK, 2005)

Aislamiento selectivo de *Escherichia coli* en Agar EMB

Fundamento del Agar EMB: el contenido en lactosa y sacarosa hace posible la distinción de *Salmonella* y *Shigella* lactosa-negativas y sacarosa-negativas, frente a la flora acompañante lactosa-negativa pero sacarosa-positiva (por ejemplo: *Proteus vulgaricus*, *Citrobacter*, *Aeromonas hydrophila*). Los gérmenes de acompañamiento indeseables, bacterias Gram (+) especialmente, resultan ampliamente inhibidas en su crecimiento, gracias a los colorantes presentes en la formulación.

RESULTADOS DESPUES DE LA INOCULACION

Forma	Redonda
Tamaño	Grande
Borde	Entero
Elevación	Convexa
Color	Negras
Brillo	Metálico
Afinidad tintorial	Gram (-)
Estructura	Bacilar
Posibles bacterias aisladas	<i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>

Nota: (MERCK, 2005)

Identificación bioquímica de las colonias obtenidas

Prueba bioquímica	Resultados
Producción de gas	+
Ácido sulfhídrico	-
Lactosa	+
Citrato	-
Úrea	-
Rojo de metilo	+
Voges Proskauer	-
Indol	+
Movilidad	+
Hidrolisis de gelatina	-

Bacteria aislada: *Escherichia coli*.

Nota: (Bergey, 1994)

4.1.3. Aislamiento e identificación de *Lactobacillus sp.* de yogurt

Aislamiento de cepas de *Lactobacillus* en Agar MRS

Fundamento del Agar MRS: los medios de cultivo MRS contienen polisorbato, acetato de magnesio y manganeso, sustancias conocidas como factores especiales de crecimiento para *Lactobacillus* así como una base nutritiva abundante y rica. Dado que sólo posee una escasa selectividad, también puede crecer especies de *Pediococcus* y *Leuconostoc*, y otros gérmes acompañantes.

Tabla 4.1. Cepas de *Lactobacillus* aisladas en agar MRS

Características morfológicas	Cepas de <i>Lactobacillus</i> aisladas de las cuatro muestras de yogurt.				
	Y1	Y2a	Y2b	Y3	Y4
<i>Forma</i>	Redonda	Redonda	Redonda	Redonda	Redonda
<i>Tamaño</i>	Pequeña	Pequeña	Grande	Pequeña	Pequeña
<i>Borde</i>	Entero	Entero	Entero	Entero	Entero
<i>Color</i>	Beige	Beige	Blanco	Beige	Beige
<i>Consistencia</i>	Crema	Crema	Crema	Crema	Crema
<i>Afinidad tintorial</i>	Gram (+)	Gram (+)	Gram (+)	Gram (+)	Gram (+)

Simbología:

- **Y1:** colonias aisladas del yogurt Alpina
- **Y2a:** colonias aisladas del yogurt Tony
- **Y2b:** colonias aisladas del yogurt Tony
- **Y3:** colonias aisladas del yogurt Florella
- **Y4:** colonias aisladas del yogurt San Luis.

Tabla 4.2. Identificación bioquímica del género *Lactobacillus*

MUESTRA P.BIOQUIMICA	Cepas de <i>Lactobacillus</i>				
	Y ₁	Y2 a	Y2 b	Y3	Y4
Anaerobiosis	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Catalasa	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Tinción Gram	Gram (+)	Gram (+)	Gram (+)	Gram (+)	Gram (+)
Formación de esporas	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Reducción de NO ₃ ⁻	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Manitol	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)

Nota: Adaptado de: (Bergey, 1994)

4.1.3.1. Identificación bioquímica de las cepas de *Lactobacillus* aisladas de yogurt

Del análisis morfológico y bioquímico de las bacterias se estableció que se disponía de dos especies bacterianas que abarcaban las cinco cepas aisladas, es decir las morfologías con codificación Y₁, Y_{2a}, Y₃, y Y₄ pertenecen a la misma especie bacteriana y Y_{2b} pertenecía a una diferente.

A las dos especies diferenciadas se les envió a un laboratorio acreditado para caracterizar el género y especie, utilizando para ello pruebas API CHL50.

Tabla 4.3. Identificación bioquímica de las especies de *Lactobacillus* aisladas

CEPAS DE <i>Lactobacillus</i>	CODIFICACIÓN	GENERO Y ESPECIE
Y1	L 1	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>
Y2a		
Y3		
Y4		
Y2b	L2	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>

4.2. Activación y confirmación bioquímica de cepas ATCC

4.2.1. Activación y confirmación de *Salmonella typhi* ATCC 14028

Crecimiento de *Salmonella typhi* ATCC 14028 en TSB

<u>Resultado</u>	<u>Características</u>
<i>Crecimiento</i>	Turbidez + + +

Confirmación bioquímica

Prueba bioquímica	Resultado
Lactosa	+
Ácido Sulhídrico	-
Ferm. de glucosa	+
Citrato	-
Urea	-
Indol	-
Gelatina	+/-

Bacteria activada: S. typhi ATCC 14028

Nota: (Bergey, 1994)

4.2.2. Activación de *Escherichia coli* ATCC 11775

Crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 11775 en TSB

<u>Resultado</u>	<u>Características</u>
<i>Crecimiento</i>	Turbidez +++

Confirmación bioquímica

Prueba bioquímica	Resultado
Producción de gas	+
Ácido sulfhídrico	-
Lactosa	+
Citrato	-
Úrea	-
Rojo de metilo	+
Voges Proskauer	-
Indol	+
Movilidad	+
Hidrolisis de gelatina	-

Bacteria activada: E. Coli ATCC 11775

Nota: (Bergey, 1994)

4.2.3. Resultados globales del aislamiento

Tabla 4.4. Bacterias patógenas aisladas para control de la actividad antimicrobiana

Bacteria aislada	Muestra	Aislamiento e identificación
<i>Salmonella sp.</i>	Carne molida	+++
<i>Escherichia coli</i>	Chochos	+++

Tabla 4.5. Bacterias lácticas para la determinación de la actividad microbiana

Bacteria aislada	Muestra	Aislamiento e identificación
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Yogures: Tony, Alpina, Florella, San Luis	+++
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Yogurt Tony	++

4.3. Evaluación de antimicrobianos producidos por *Lactobacillus*

4.3.1. Evaluación del mejor medio de cultivo a ser utilizado en las pruebas de detección de antimicrobianos

Tabla 4.6. Bacterias – Medios de cultivo

BACTERIAS que crecen en un medio de cultivo común	AGAR MRS				AGAR SANGRE				MEDIO DE CULTIVO DE CONTROL			
	1C	2C	3C	4C	1C	2C	3C	4C	1C	2C	3C	4C
<i>S. typhi</i> ATCC 14028	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+
<i>S. sp.</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
<i>E. coli</i> ATCC 11775	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
<i>L. bulgaricus</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
<i>L. rhamnosus</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+

Simbología:

- +: Presencia de bacterias
- - : Ausencia de bacterias
- 1C: Primer cuadrante de la caja petri
- 2C: Segundo cuadrante de la caja petri
- 3C: Tercer cuadrante de la caja petri
- 4C: Cuarto cuadrante de la caja petri.

Criterios de Selección de los medios de cultivo de crecimiento de bacterias no Target

Criterio 1.- medio seleccionado en el que se registre crecimiento en el tercer y cuarto cuadrante

Criterio 2- medio no seleccionado, en el que se registre crecimiento en el 1 y 2 cuadrante.

Como se puede apreciar en la tabla N° 4.6, el agar MRS es el medio seleccionado para realizar la investigación.

4.3.2. Inhibición en caldo

Tabla 4.7. Inhibición de cepas ATCC en caldo MRS

Concentraciones de la suspensión metabólica	MICROORGANISMOS A EVALUAR					
	<i>Salmonella typhi</i> ATCC 14028			<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775		
	L1	L2	C	L1	L2	C
0 ppm	+	+	+	+	+	+
50 ppm	+	+	+	+	+	+
60 ppm	+	+	+	+	+	+
70 ppm	+	+	+	+	+	+
80 ppm	+	+	-	+	+	-
90 ppm	+	+	-	+	+	-
100 ppm	+	+	-	+	+	-
120 ppm	+	+	-	+	+	-
140 ppm	+	+	-	+	+	-
160 ppm	+	+	-	+	+	-
180 ppm	+	+	-	+	+	-
200 ppm	+	+	-	+	+	-
220 ppm	+	+	-	+	+	-
240 ppm	+	+	-	+	+	-
260 ppm	+	+	-	+	+	-
280 ppm	+	+	-	+	+	-

Tabla 4.8. Inhibición de cepas aisladas de alimentos en caldo MRS

Concentraciones de la suspensión metabólica	MICROORGANISMOS A EVALUAR					
	<i>Salmonella sp.</i>			<i>Escherichia coli</i>		
	L1	L2	C	L1	L2	C
0 ppm	+	+	+	+	+	+
50 ppm	+	+	+	+	+	+
60 ppm	+	+	+	+	+	+
70 ppm	+	+	+	+	+	+
80 ppm	+	+	-	+	+	-
90 ppm	+	+	-	+	+	-
100 ppm	+	+	-	+	+	-
120 ppm	+	+	-	+	+	-
140 ppm	+	+	-	+	+	-
160 ppm	+	+	-	+	+	-
180 ppm	+	+	-	+	+	-
200 ppm	+	+	-	+	+	-
220 ppm	+	+	-	+	+	-
240 ppm	+	+	-	+	+	-
260 ppm	+	+	-	+	+	-
280 ppm	+	+	-	+	+	-

Simbología:

- (+): presencia de bacterias.
- (-): ausencia de bacterias.
- L1: Representa la solución metabólica del *Lactobacillus bulgaricus*

- L2: Representa la solución metabólica del *Lactobacillus rhamnosus*.
- C: Representa la solución metabólica del *Lactobacillus* control.

4.3.3. Inhibición en agar

Tabla 4.9. Inhibición de cepas ATCC en agar MRS

Microorganismos Inhibidores	MICROORGANISMOS A INHIBIR					
	<i>Salmonella typhi</i> ATCC 14028			<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775		
<i>Lactobacillus L1</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Lactobacillus L2</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Lactobacillus C</i>	-	-	-	-	-	-

Tabla 4.10. Inhibición de cepas aisladas de alimentos en agar MRS

Microorganismos Inhibidores	MICROORGANISMOS A INHIBIR					
	<i>Salmonella sp</i>			<i>Escherichia coli</i>		
<i>Lactobacillus L1</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Lactobacillus L2</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Lactobacillus C</i>	-	-	-	-	-	-

Simbología:

- (+): presencia de bacterias.
- (-): ausencia de bacterias.
- L1: Representa la solución metabólica del *Lactobacillus bulgaricus*.
- L2: Representa la solución metabólica del *Lactobacillus rhamnosus*.
- C: Representa la solución metabólica del *Lactobacillus* control.

4.4. Resultados de la segunda fase experimental: Influencia del pH

No se realizó la segunda fase experimental debido a que los *Lactobacillus* aislados no presentaron capacidad antimicrobiana.

4.5. Resultados de la tercera fase experimental: Influencia de la temperatura y tiempo de almacenamiento

No se realizó la tercera fase experimental debido a que los *Lactobacillus* aislados no presentaron capacidad antimicrobiana.

4.6. Discusión de los resultados obtenidos

En la tabla 4.4 se puede observar que *Salmonella sp.*, se logra aislar e identificar en la totalidad de las muestras recolectadas de carne molida (3 muestras) con el fin de contar con cepas de control para la prueba de producción de antimicrobianos. De la misma forma se observa que se aísla e identifica *Escherichia coli*, en el 100% de las muestras de chochos recolectadas (3 muestras). Cabe recalcar que la presencia de los microorganismos patógenos encontrados en la carne molida, superan los límites permitidos mencionados en la norma NTE INEN 1338, y en los chochos los límites de microorganismos coliformes excede a los criterios establecido en la norma NTE INEN 2390.

Siguiendo la secuencia metodológica, se procedió a aislar los microorganismos lácticos y de las cuatro muestras analizadas de yogurt de mayor expendio en la ciudad de Quito, se pudieron aislar cinco cepas de *Lactobacillus*; como se puede observar en la tabla 4.5, las cepas aisladas pertenecían a dos únicas especies bioquímicamente identificadas: *L. bulgaricus* y *L. rhamnosus*.

En cuanto a la declaración en la etiqueta, los yogures comerciales mencionan el género y la especie de las bacterias lácticas mientras que los artesanales solo declaran el uso de fermentos lácticos incumpliendo con la normativa especificada en el Codex Alimentario (CODEX- STAN A-11(a) y en el Decreto N°19091 del Ministerio de Economía, Industria y Comercio.

Es importante mencionar que el *Lactobacillus bulgaricus*. y el *Lactobacillus rhamnosus*, según menciona la bibliografía, son cepas utilizadas a nivel

mundial para la elaboración de yogurt y productos con características probióticas debido a su comprobada capacidad de producción de compuestos orgánicos de bajo peso molecular, que actúan como antimicrobianos y además porque manifiestas otras características que favorecen el crecimiento de flora benéfica debido a que aportan a la digestibilidad de sustancias complejas y tienen gran capacidad de adherencia epitelial (Vaseva, 2010); no obstante, al realizar la prueba de producción de antimicrobianos a estas bacterias aisladas el resultado de la inhibición fue negativo.

En la tabla 4.6 se puede evidenciar los medios de cultivo evaluados para llevar a cabo la prueba de producción de antimicrobianos, siendo el elegido el agar MRS, debido a que permite el crecimiento adecuado de todas las bacterias participantes en la experimentación. Este medio específico para *Lactobacillus* posee en su composición elementos nutritivos como proteasas de peptonas, extracto de carne, extracto de peptona y una serie de compuestos que sirven como cofactores necesarios para el crecimiento de estas bacterias. Además posee citrato de amonio que actúa como inhibidor de la flora Gram negativa, sin embargo, se puede evidenciar que el crecimiento de las bacterias Gram negativas (*Salmonella sp.*, *Salmonella typhi* y *Escherichia coli*) utilizadas fue favorable hasta el tercer cuadrante del medio.

De las tablas 4.7, 4.8, 4.9 y 4.10 se puede establecer que las cepas de *Lactobacillus* aisladas dan negativo a la prueba de producción de antimicrobianos realizada, tanto en medio líquido como sólido y que, la única bacteria láctica que logra inhibir el crecimiento de los microorganismos entéricos, es la cepa de control *Lactobacillus acidophilus*, reconocido a nivel mundial por su gran capacidad bactericida, no solo por la producción de antimicrobianos sino también porque presenta gran capacidad de adherencia epitelial, gran resistencia a pH ácido y gran capacidad de adaptación al medio con lo que compite fuertemente por el alimento (DANISCO, 2005). Este microorganismo fue adquirido en forma farmacéutica y sus características antimicrobianas se pudieron verificar con claridad en la presente investigación (*Lactobacillus acidophilus*: Laboratorio Sundown Naturals, Estados Unidos, dos billones de flora activa por cápsula).

Del análisis de estas mismas tablas se puede derivar también, que existe concordancia en los resultados obtenidos para la prueba de producción de antimicrobianos tanto por el método de Concentración Mínima Inhibitoria como por el método de Difusión en Agar, verificando así la eficiencia de la metodología propuesta.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

5.1.1. Producción de antimicrobianos

- Se acepta la hipótesis nula propuesta en esta investigación en base a que los microorganismos lácticos evaluados no presentan capacidad antimicrobiana debido a que no inhiben el crecimiento de los microorganismos causantes de afecciones entéricas propuestos.
- El *Lactobacillus acidophilus*, utilizado como cepa patrón en esta investigación, posee gran capacidad antimicrobiana y logra inhibir a los microorganismos sujetos de estudio.
- El yogurt Tony declara tener como flora probiótica el *Lactobacillus GG*, sin especificar la especie de esta bacteria láctica, por lo que incumple con la normativa de etiquetado vigente.
- La presente investigación logra aislar del yogurt Tony el *Lactobacillus rhamnosus*, el cual da negativo a la prueba de producción de antimicrobianos.
- Un hecho a resaltar es que el medio adecuado para el crecimiento de todas las bacterias participantes en la experimentación fue el agar MRS, debido a compleja composición química y que, a pesar de sus compuestos inhibidores de flora Gram negativa, permite un buen crecimiento de las cepas de los géneros *Salmonella* y *Escherichia* utilizadas.

5.1.2. Evaluación de factores ambientales

No se pudo evaluar el efecto de los factores ambientales sobre la efectividad de los extractos metabólicos de cepas de *Lactobacillus*, debido a que las cepas analizadas no presentaron capacidad antimicrobiana.

5.2. Recomendaciones

El presente trabajo de investigación propone las siguientes recomendaciones en función de los resultados obtenidos:

- Que la industria de alimentos ecuatoriana incursione en el desarrollo de productos con microorganismos probióticos y que sea el *Lactobacillus acidophilus*, uno de las bacterias utilizadas por su gran capacidad antimicrobiana, demostrada en esta experimentación.
- Que la autoridad de Vigilancia y Control Sanitario ponga énfasis en la inspección de las industrias de alimentos y verifiquen el cumplimiento de las Normas de Etiquetado vigentes.
- Además, se propone que las investigaciones en esta temática se orienten al aislamiento y estudios clínicos de las cepas probióticas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Adeniyi, B., Ayeni, F., & Ogunbanwo, S. (2006). Antagonistic activities of Lactic Acid Bacteria isolated from nigerian fermented dairy food againts organisms implicated in urinary tract infection. Asian Network for Scientific Information, pág 183 -188, <http://scialert.net/abstract/?doi=biotech.2006.183.188>
2. Aguavil, J. C. (2012). “Evaluación del efecto de un probiótico nativo elaborado en base a *Lactobacillus acidophilus* y OSS-308 en Santo Domingo de los Tsáchilas”. Santo Domingo, Universidad Politécnica del Ejército. <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/5213/1/T-ESPEIASA%20II%20.pdf>).
3. FAO. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Estados Unidos: <http://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>.
4. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. (2010). Microbiological Methods. Estados Unidos: <http://www.fda.org/docrep/005/y1579e/y1579e04.htm>.
5. García, M. (22 de Marzo de 2011). Probióticos y prebióticos. Aliados de la salud. El Mundo del Bienestar. España: Gráficas Ulzama.
6. Garcia, P., Paredes, F., & Fernandez, M. (2002). Microbiologia clinica practica. Barcelona: Repeto.
7. Gutierrez, L., & Acosta, E. (2008). Determinacion del potencial bactericida In vitro de un aislado nativo de *Lactobacillus casei* frente *E. coli*. Revista Lasallista de Investigación, pag 68-73, <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69550209>
8. INEC. (2010). Anuario de Estadísticas Hospitalarias, camas y egresos, Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. http://www.inec.gob.ec/inec/index.php?option=com_content&view=article&id=180&Itemid=402&lang=es.
9. INEC. (2010). III Censo de Poblacion y Vivienda, Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. http://www.ecuadorencifras.com/cifras-inec/main.html?TB_iframe=true&height=530&width=1100.



10. Koneman, E., Stephen, A., & UR, D. (2008). Diagnóstico Microbiológico. Buenos Aires: Panamericana.
11. Le Mair, A. (2008). Probióticos y Prebióticos. Publicacion de la Organización Mundial de Gastroenterología, Barcelona, Continental.
12. MERCK. (2005). Microbiology Manual. Alemania.
13. MSP. (2009). *Incidencia Anual de Enfermedades Diarreicas en el Ecuador*, Ministerio de Salud Pública del Ecuador, www.msp.gob.ec/index.php?option=com_content&view=article&id=13&Itemid=44.
14. Pares, R., & Juarez, A. (2002). Bioquímica de los microorganismos. Barcelona: Reverte.
15. Rojas, C., & Vargas, P. (2007). Bacteriocinas: sustituto de preservantes tradicionales en la industria alimentaria. Tecnología en marcha. Barcelona, Reverte.
16. Samaniego, L. M., & Sosa del Castillo, M. (2002). *Lactobacillus spp.: Importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora*. Publicación del Centro de Estudios Biotecnológicos. Facultad de Agronomía. Universidad de Matanzas, pág 12-14.
17. Sociedad Española. (1993). *Microbiología: Volumen monográfico de Alimentos*. Barcelona: Garsi.
18. Tormo, R. (2006). Probióticos en Nutrición Infantil. *Probióticos. Concepto y mecanismos de acción*. Barcelona, España: Reverte.
19. Vaseva, I. (2010). *Probiotic activity of Lactobacillus delbrueckii subespecie bulgaricus in the oral cavity*. Helsinki: <http://www.doria.fi/bitstream/handle/10024/59448/probioti.pdf>.

ANEXOS

Anexo 1. Certificación de las Cepas ATCC



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium Catalog Number: 0363 Lot Number: 363-123 Reference Number: ATCC® 14028™ Purity: Pure Recovery: > 1000 CFUs per Pellet Passage from Reference: 4 Expiration Date: 2013/02		Additional Information Release Information: Quality Control Technologist: Christine Condon Release Date: 2011/5/4 Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.																																																																																																
Performance																																																																																																		
Macroscopic Features: Medium, gray/white, circular, convex colonies Microscopic Features: Gram negative straight rod		Medium: SBAP Method: Gram Stain																																																																																																
Vitek GN <table border="1"> <thead> <tr> <th>Phenotypic Features</th> <th>Results</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>ADONITOL</td><td>-</td></tr> <tr><td>L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>ARABITOL</td><td>-</td></tr> <tr><td>CELLOBIOSE</td><td>-</td></tr> <tr><td>BETA-GALACTOSIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>H2S PRODUCTION</td><td>+</td></tr> <tr><td>BETA-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>Glutamyl Arylamidase pNA</td><td>-</td></tr> <tr><td>D-GLUCOSE</td><td>+</td></tr> <tr><td>GAMMA-GLUTAMYL-TRANSFERASE</td><td>+</td></tr> <tr><td>FERMENTATION/GLUCOSE</td><td>+</td></tr> <tr><td>BETA-GLUCOSIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>D-MALTOSE</td><td>+</td></tr> <tr><td>D-MANNITOL</td><td>+</td></tr> <tr><td>D-MANNOSE</td><td>+</td></tr> <tr><td>BETA-XYLOSIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>BETA-Alanine arylamidase pNA</td><td>-</td></tr> <tr><td>L-Proline ARYLAMIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>LIPASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>PALATINOSE</td><td>-</td></tr> <tr><td>Tyrosine ARYLAMIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>UREASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>D-SORBITOL</td><td>+</td></tr> <tr><td>SACCHAROSE/SUCROSE</td><td>-</td></tr> <tr><td>D-TAGATOSE</td><td>-</td></tr> <tr><td>D-TREHALOSE</td><td>+</td></tr> <tr><td>CITRATE (SODIUM)</td><td>+</td></tr> <tr><td>MALONATE</td><td>-</td></tr> <tr><td>2-ETO-D-GLUCONATE</td><td>-</td></tr> <tr><td>LACTATE alkalization</td><td>+</td></tr> <tr><td>ALPHA-GLUCOSIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>SUCCINATE alkalization</td><td>+</td></tr> <tr><td>BETA-N-ACETYL-GALACTOSAMINIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>ALPHA-GALACTOSIDASE</td><td>+</td></tr> <tr><td>PHOSPHATASE</td><td>+</td></tr> <tr><td>Glycine ARYLAMIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>ORNITHINE DECARBOXYLASE</td><td>+</td></tr> <tr><td>LYSINE DECARBOXYLASE</td><td>+</td></tr> <tr><td>L-HISTIDINE assimilation</td><td>-</td></tr> <tr><td>COURMARATE</td><td>+</td></tr> <tr><td>BETA-GLUCORONIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>O/129 RESISTANCE (comp.vibrio.)</td><td>-</td></tr> <tr><td>Glu-Gly-Arg-ARYLAMIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>L-MALATE assimilation</td><td>-</td></tr> <tr><td>ELLMAN</td><td>-</td></tr> <tr><td>L-LACTATE assimilation</td><td>-</td></tr> </tbody> </table>		Phenotypic Features	Results	Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE	-	ADONITOL	-	L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE	-	ARABITOL	-	CELLOBIOSE	-	BETA-GALACTOSIDASE	-	H2S PRODUCTION	+	BETA-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE	-	Glutamyl Arylamidase pNA	-	D-GLUCOSE	+	GAMMA-GLUTAMYL-TRANSFERASE	+	FERMENTATION/GLUCOSE	+	BETA-GLUCOSIDASE	-	D-MALTOSE	+	D-MANNITOL	+	D-MANNOSE	+	BETA-XYLOSIDASE	-	BETA-Alanine arylamidase pNA	-	L-Proline ARYLAMIDASE	-	LIPASE	-	PALATINOSE	-	Tyrosine ARYLAMIDASE	-	UREASE	-	D-SORBITOL	+	SACCHAROSE/SUCROSE	-	D-TAGATOSE	-	D-TREHALOSE	+	CITRATE (SODIUM)	+	MALONATE	-	2-ETO-D-GLUCONATE	-	LACTATE alkalization	+	ALPHA-GLUCOSIDASE	-	SUCCINATE alkalization	+	BETA-N-ACETYL-GALACTOSAMINIDASE	-	ALPHA-GALACTOSIDASE	+	PHOSPHATASE	+	Glycine ARYLAMIDASE	-	ORNITHINE DECARBOXYLASE	+	LYSINE DECARBOXYLASE	+	L-HISTIDINE assimilation	-	COURMARATE	+	BETA-GLUCORONIDASE	-	O/129 RESISTANCE (comp.vibrio.)	-	Glu-Gly-Arg-ARYLAMIDASE	-	L-MALATE assimilation	-	ELLMAN	-	L-LACTATE assimilation	-	Other Features/ Challenges: Results Oxidase (Kovacs): negative Hektoen Enteric agar: good growth, blue-green colonies with black centers Salmonella O antiserum Factor O:4 (Included in group B): positive Salmonella O antiserum Factor O:5 (Included in group B): positive Salmonella O antiserum Factor O:12 (Included in group B): positive  Brad Goskowitz, President AUTHORIZED SIGNATURE
Phenotypic Features	Results																																																																																																	
Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE	-																																																																																																	
ADONITOL	-																																																																																																	
L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE	-																																																																																																	
ARABITOL	-																																																																																																	
CELLOBIOSE	-																																																																																																	
BETA-GALACTOSIDASE	-																																																																																																	
H2S PRODUCTION	+																																																																																																	
BETA-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE	-																																																																																																	
Glutamyl Arylamidase pNA	-																																																																																																	
D-GLUCOSE	+																																																																																																	
GAMMA-GLUTAMYL-TRANSFERASE	+																																																																																																	
FERMENTATION/GLUCOSE	+																																																																																																	
BETA-GLUCOSIDASE	-																																																																																																	
D-MALTOSE	+																																																																																																	
D-MANNITOL	+																																																																																																	
D-MANNOSE	+																																																																																																	
BETA-XYLOSIDASE	-																																																																																																	
BETA-Alanine arylamidase pNA	-																																																																																																	
L-Proline ARYLAMIDASE	-																																																																																																	
LIPASE	-																																																																																																	
PALATINOSE	-																																																																																																	
Tyrosine ARYLAMIDASE	-																																																																																																	
UREASE	-																																																																																																	
D-SORBITOL	+																																																																																																	
SACCHAROSE/SUCROSE	-																																																																																																	
D-TAGATOSE	-																																																																																																	
D-TREHALOSE	+																																																																																																	
CITRATE (SODIUM)	+																																																																																																	
MALONATE	-																																																																																																	
2-ETO-D-GLUCONATE	-																																																																																																	
LACTATE alkalization	+																																																																																																	
ALPHA-GLUCOSIDASE	-																																																																																																	
SUCCINATE alkalization	+																																																																																																	
BETA-N-ACETYL-GALACTOSAMINIDASE	-																																																																																																	
ALPHA-GALACTOSIDASE	+																																																																																																	
PHOSPHATASE	+																																																																																																	
Glycine ARYLAMIDASE	-																																																																																																	
ORNITHINE DECARBOXYLASE	+																																																																																																	
LYSINE DECARBOXYLASE	+																																																																																																	
L-HISTIDINE assimilation	-																																																																																																	
COURMARATE	+																																																																																																	
BETA-GLUCORONIDASE	-																																																																																																	
O/129 RESISTANCE (comp.vibrio.)	-																																																																																																	
Glu-Gly-Arg-ARYLAMIDASE	-																																																																																																	
L-MALATE assimilation	-																																																																																																	
ELLMAN	-																																																																																																	
L-LACTATE assimilation	-																																																																																																	
Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.																																																																																																		
 The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.																																																																																																		
© 2010 Microbiologics, Inc. All Rights Reserved. 217 Osseo Avenue North Saint Cloud, MN 55303		DOC.266 REVISION 2010.May.20/dt/ml																																																																																																



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications		Additional Information
Microorganism Name: Escherichia coli (serovar O1:K1:H7) Catalog Number: 0465 Lot Number: 465-67 Reference Number: ATCC® 11775™** Purity: Pure Recovery: > 1000 CFUs per Pellet Passage from Reference: 4 Expiration Date: 2013/01		Release Information: Quality Control Technologist: Megan Murn Release Date: 2011/4/4 Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.
Performance		
Macroscopic Features: Two colony types present. One type is large, circular, convex, entire edge, gray and smooth. The other type is slightly larger, irregular, convex, slightly erose edge, gray and slightly rough.	Medium: SBAP	
Microscopic Features: Gram negative straight rod.	Method: Gram Stain	
Vitek GN		Other Features/ Challenges: Results Oxidase (Kovacs): negative
Phenotypic Features	Results	
Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE	-	
ADONITOL	-	
-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE	-	
ARABITOL	-	
D-CELLOBIOSE	-	
BETA-GALACTOSIDASE	+	
H2S PRODUCTION	-	
BETA-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE	-	
Glutamyl Arylamidase pNA	-	
D-GLUCOSE	+	
GAMMA-GLUTAMYL-TRANSFERASE	+	
FERMENTATION/GLUCOSE	+	
BETA-GLUCOSIDASE	-	
D-MALTOSE	+	
D-MANNITOL	+	
D-MANNOSE	+	
BETA-XYLOSIDASE	-	
BETA-Alanine arylamidase pNA	-	
L-Proline ARYLAMIDASE	-	
LIPASE	-	
PALATINOSE	-	
Tyrosine ARYLAMIDASE	+	
UREASE	-	
D-SORBITOL	+	
SACCHAROSE/SUCROSE	-	
D-TAGATOSE	-	
D-TREHALOSE	+	
CITRATE (SODIUM)	-	
ALONATE	-	
ETO-D-GLUCONATE	-	
L-LACTATE alkalization	-	
ALPHA-GLUCOSIDASE	+	
SUCCINATE alkalization	+	
BETA-N-ACETYL-GALACTOSAMINIDASE	-	
ALPHA-GALACTOSIDASE	+	
PHOSPHATASE	+	
Glycine ARYLAMIDASE	-	
ORNITHINE DECARBOXYLASE	+	
LYSINE DECARBOXYLASE	+	
L-HISTIDINE assimilation	-	
COURMARATE	+	
BETA-GLUCORONIDASE	+	
O/129 RESISTANCE (comp.vibrio.)	+	
Glu-Gly-Arg-ARYLAMIDASE	-	
L-MALATE assimilation	-	
ELLMAN	+	
L-LACTATE assimilation	-	
		 Brad Goskowicz, President AUTHORIZED SIGNATURE

Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.

* ATCC Licensed Derivative The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.

© 2010 Microbiologics, Inc. All Rights Reserved. 217 Osseo Avenue North Saint Cloud, MN 56303

DOC.286 REVISION 2010.May.20/dt/ml

Anexo 2. Identificación de los *Lactobacillus* aislados



Centro de Investigaciones Microbiológicas y Control de Calidad

Quito, 28 de diciembre de 2012

Señorita:
Vanessa Torres
UCE – Facultad BF
Ciudad.-

Teléfono: 098-7585327

REPORTE DE LABORATORIO

REF: 12-12769/70

Muestras: Cultivos de bacterias en caldo MRS
Análisis solicitado: Identificación de bacterias
Fecha de recepción: 14/12/2012

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

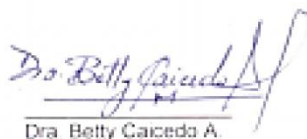
Código Laboratorio	Muestra	Bacteria Identificada
12-12769	Cultivo MRS L1V	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> spp <i>bulgaricus</i>
12-12770	Cultivo MRS L2T	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>

Observación:

Luego del aislamiento y purificación de las bacterias en agar MRS se realizó la identificación con las galerías API y otras pruebas bioquímicas adicionales.

Se adjuntan resultados API

Atentamente,


Dra. Betty Caicedo A.

Pruebas API para el *Lactobacillus* L1

apiweb™ - Resultado de identificación

Page 1 of 1

-

API 50 CHL V5.1

-

-

-

-

-

-

-

-

-

-

0

1

2

3

4

5

6

7

8

9

-

+

+

-

-

-

-

-

-

-

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

-

-

-

-

-

-

-

-

-

+

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

-

-

-

-

-

-

-

-

-

-

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

-

-

-

-

-

-

-

-

-

-

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

REFERENCIA

FECHA

MRS-L1V

23/12/2012

COMENTARIO

MUY BUENA IDENTIFICACION

Galeria

API 50 CHL V5.1

Perfil

.....+ +

Nota

Taxón significativo

% ID

T

Pruebas en contra

Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus

99.7

1.0

Taxón siguiente

% ID

T

Pruebas en contra

Streptococcus thermophilus

0.2

0.0

SAC 100%

Cerrar

Imprimir

52

Pruebas API para el *Lactobacillus* L2

apiweb™ - Resultado de identificación

Page 1 of 1



API 50 CHL V5.1



REFERENCIA: MRS-L2T
FECHA: 23/12/2012
COMENTARIO:

EXCELENTE IDENTIFICACION

Galeria: API 50 CHL V5.1
Perfil:
Nota:

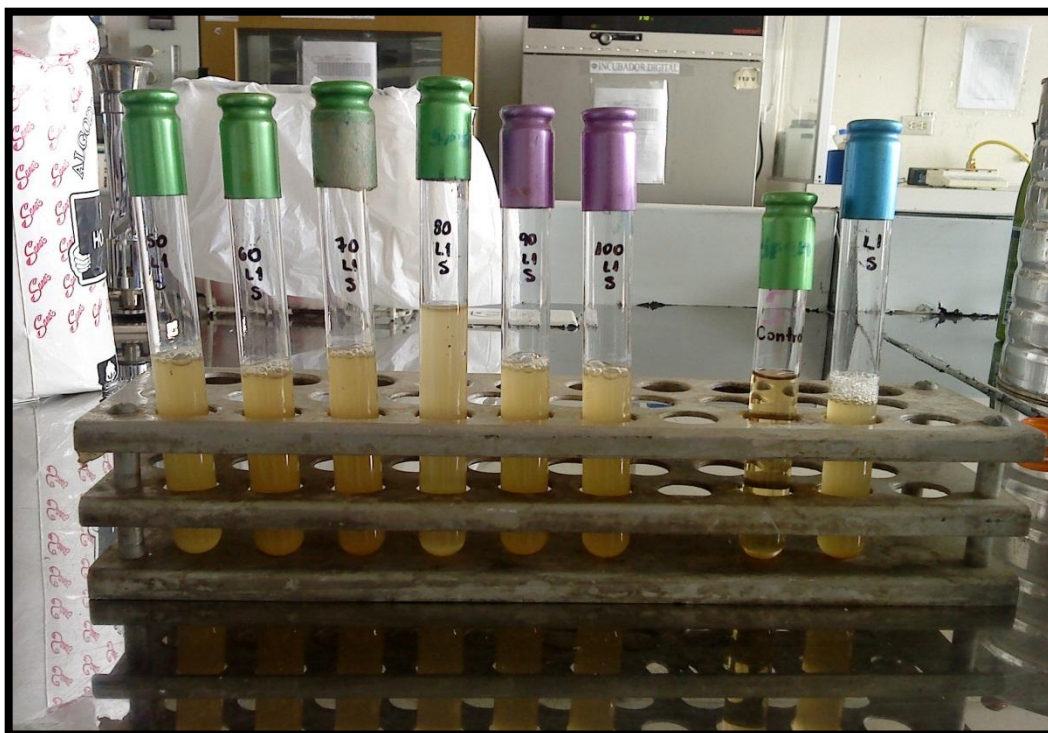
Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra							
Lactobacillus rhamnosus	99.9	0.88	DUL 14%							
Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra							
Lactobacillus paracasei ssp paracasei 1	0.1	0.48	GLY	20%	RHA	1%	DUL	13%	INO	6%
			LYX	20%						

Cerrar

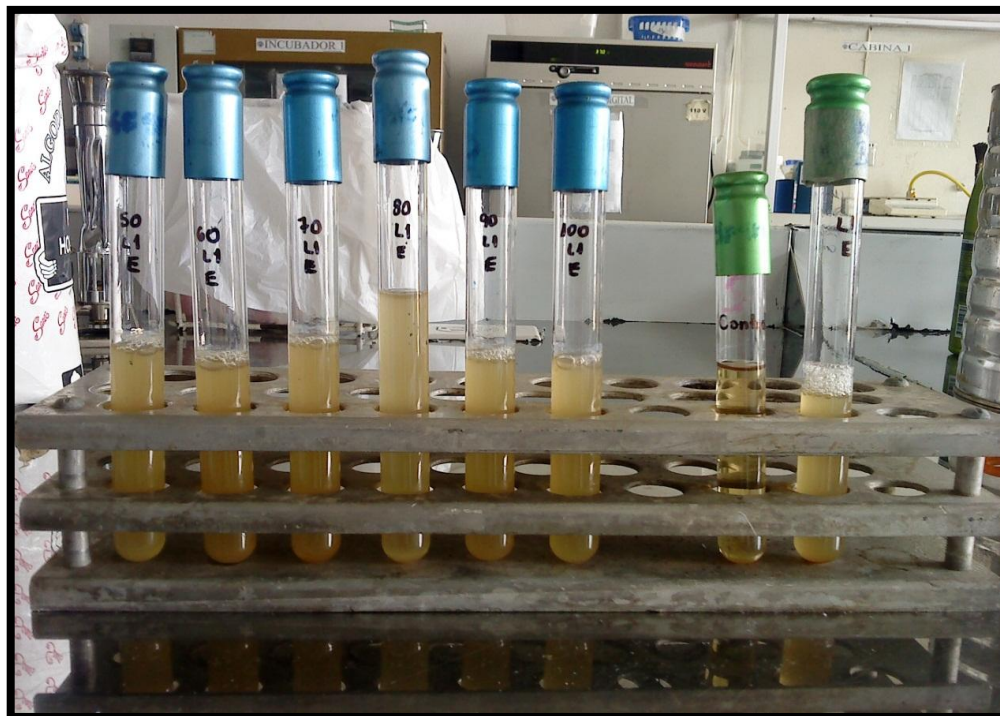
Imprimir

Anexo 3. Resultados de la inhibición en caldo

Lactobacillus L1 (*Lactobacillus bulgaricus*) frente a *Salmonella*. sp.



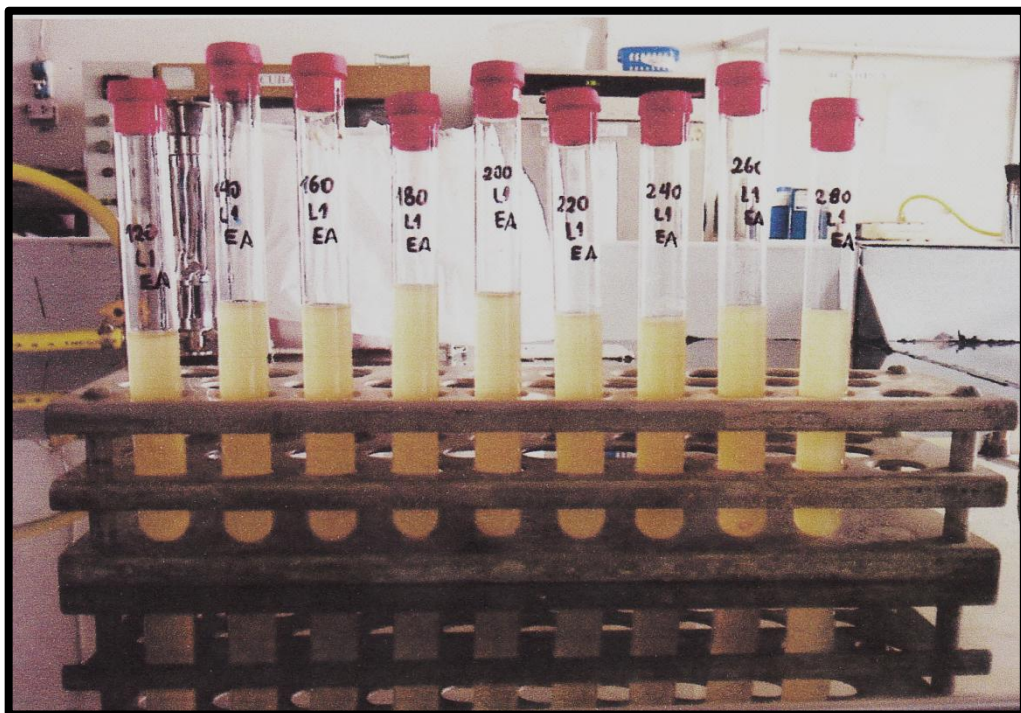
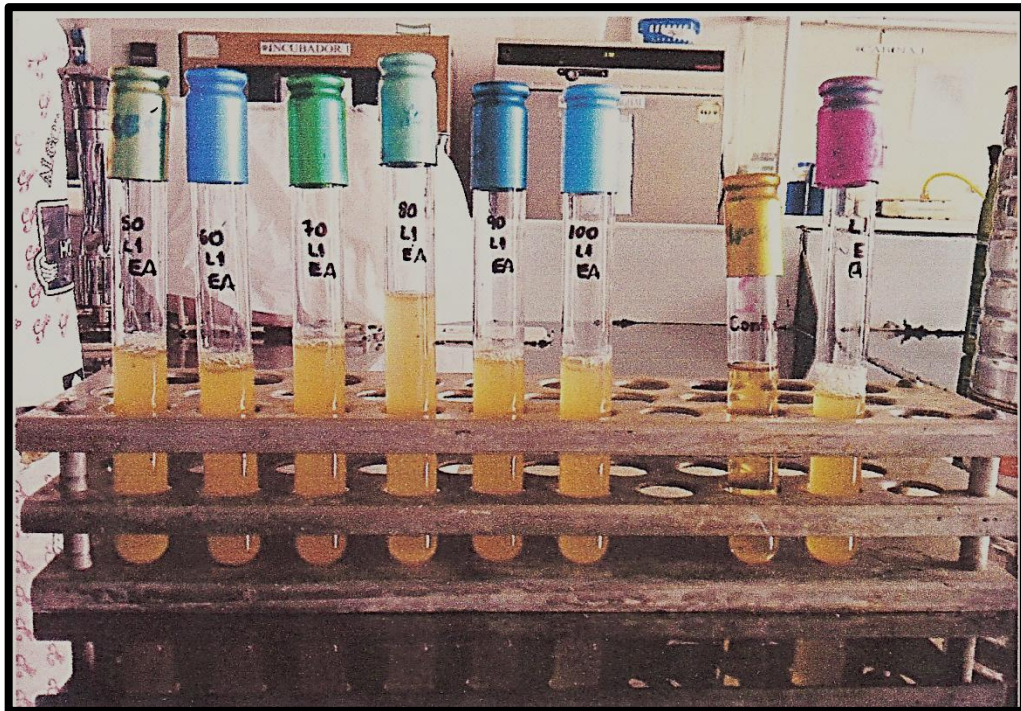
Lactobacillus L1 (*Lactobacillus bulgaricus*) frente a *E. coli*



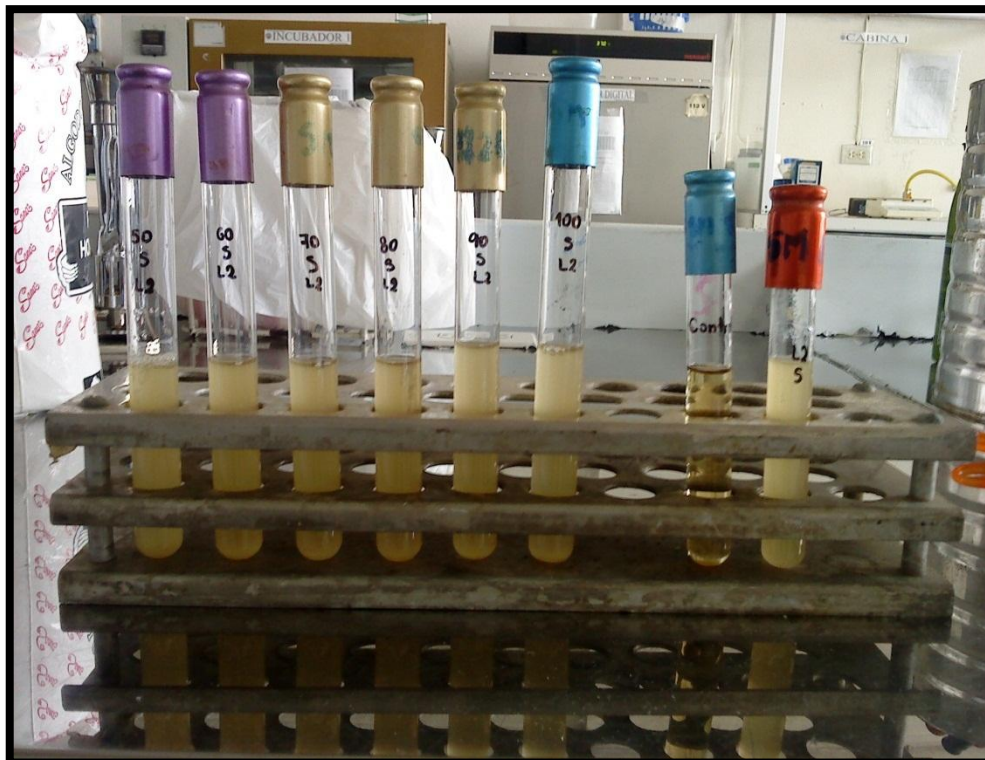
Lactobacillus L1 (*Lactobacillus bulgaricus*) frente a *S. typhi* ATCC 14028



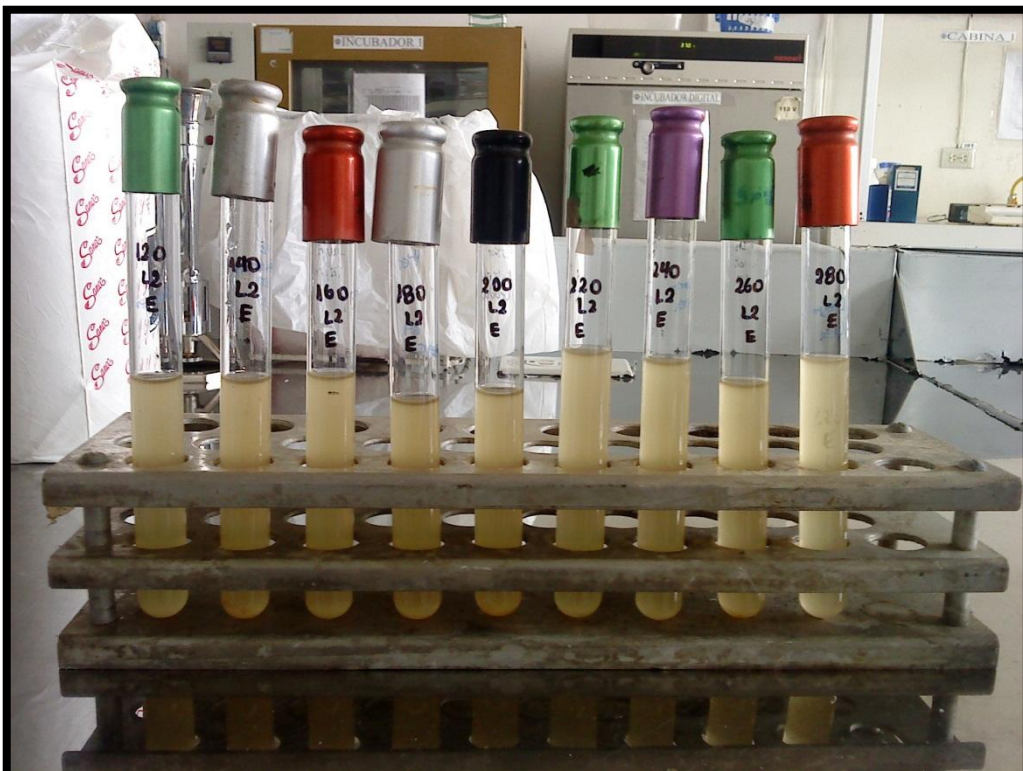
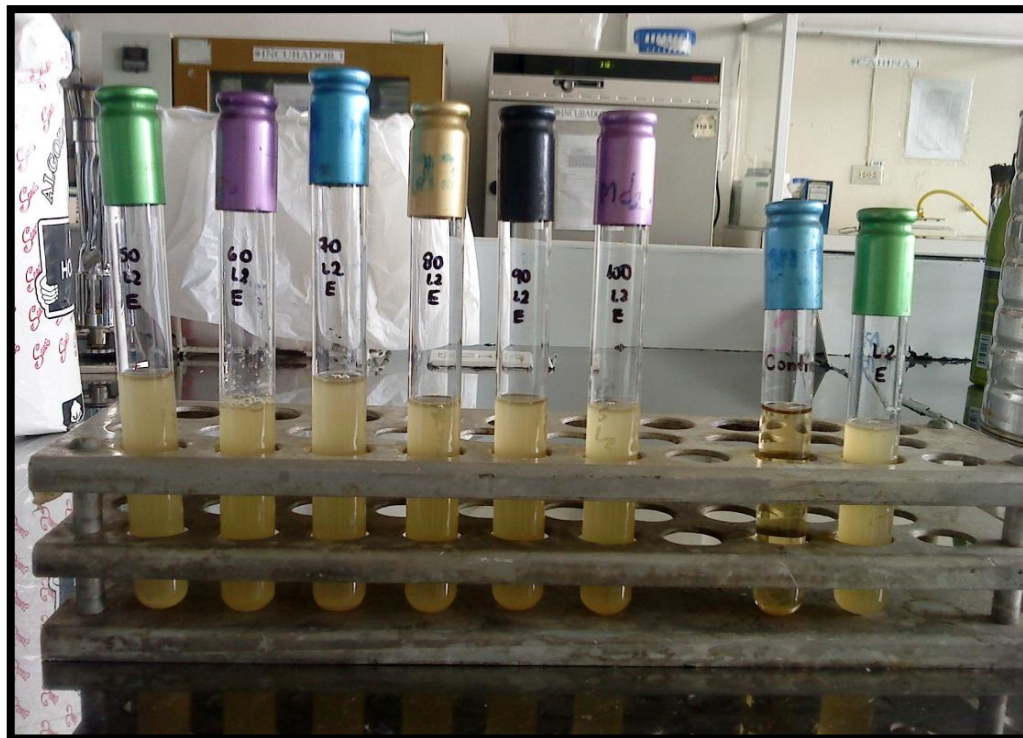
Lactobacillus L1 (*Lactobacillus bulgaricus*) frente a *E. coli* ATCC 11775



Lactobacillus L2 (*Lactobacillus rhamnosus*) frente a *Salmonella* sp.



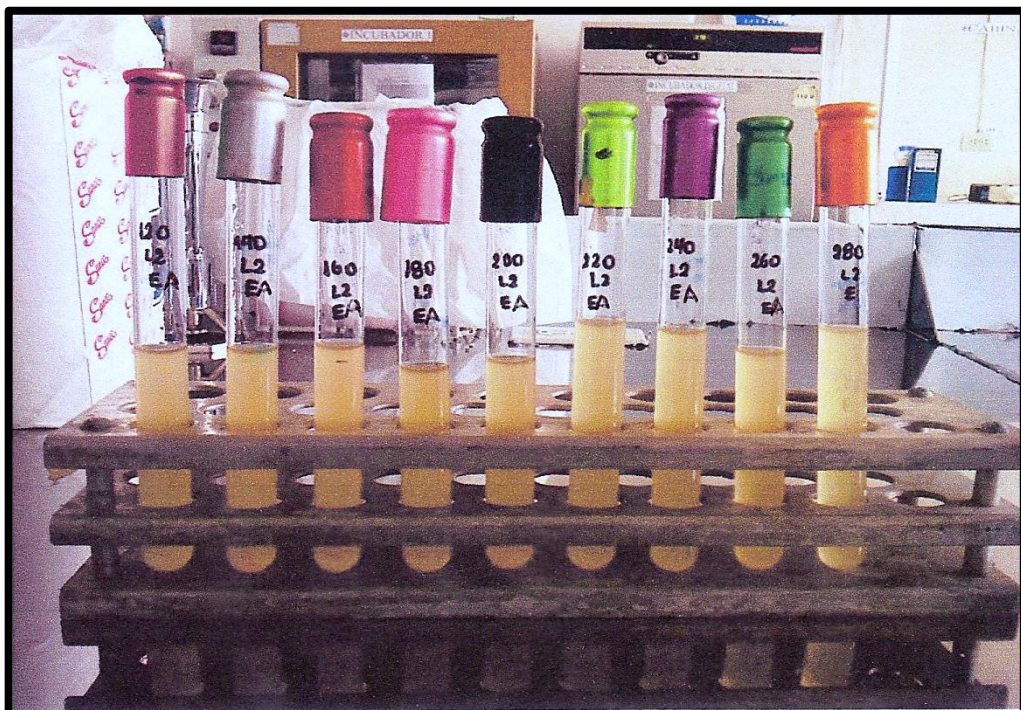
Lactobacillus L2 (*Lactobacillus rhamnosus*) frente a *E. coli*



Lactobacillus L2 (*Lactobacillus rhamnosus*) frente a *S. typhi* ATCC 14028



Lactobacillus L2 (*Lactobacillus rhamnosus*) frente a *E. coli* ATCC 11775



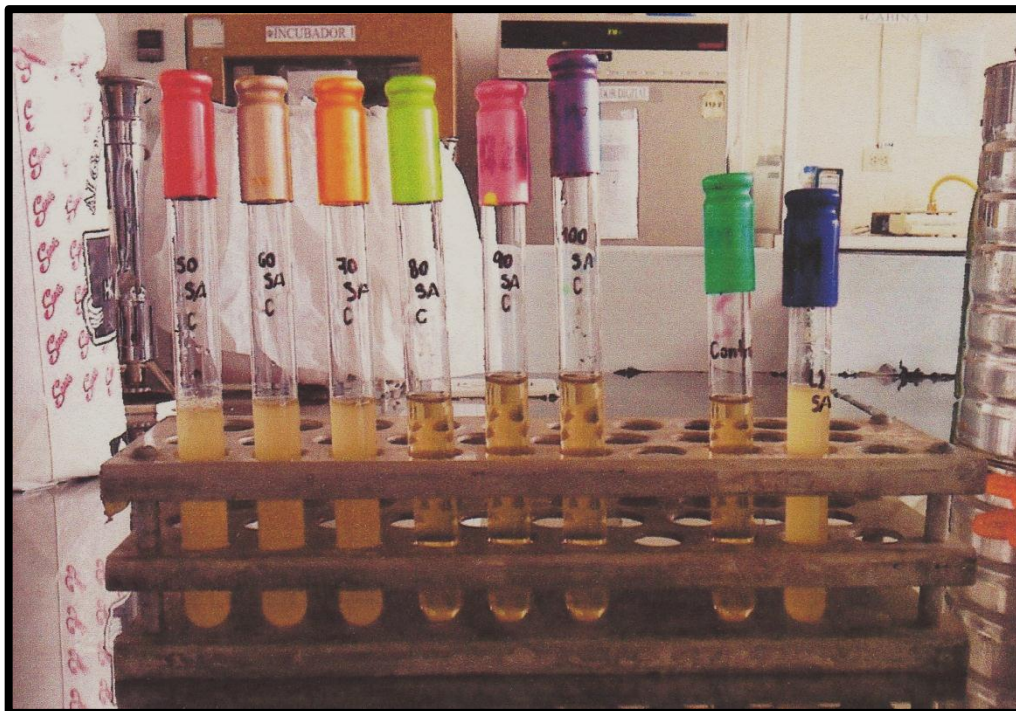
Lactobacillus C (Lactobacillus acidophilus) frente a Salmonella sp.



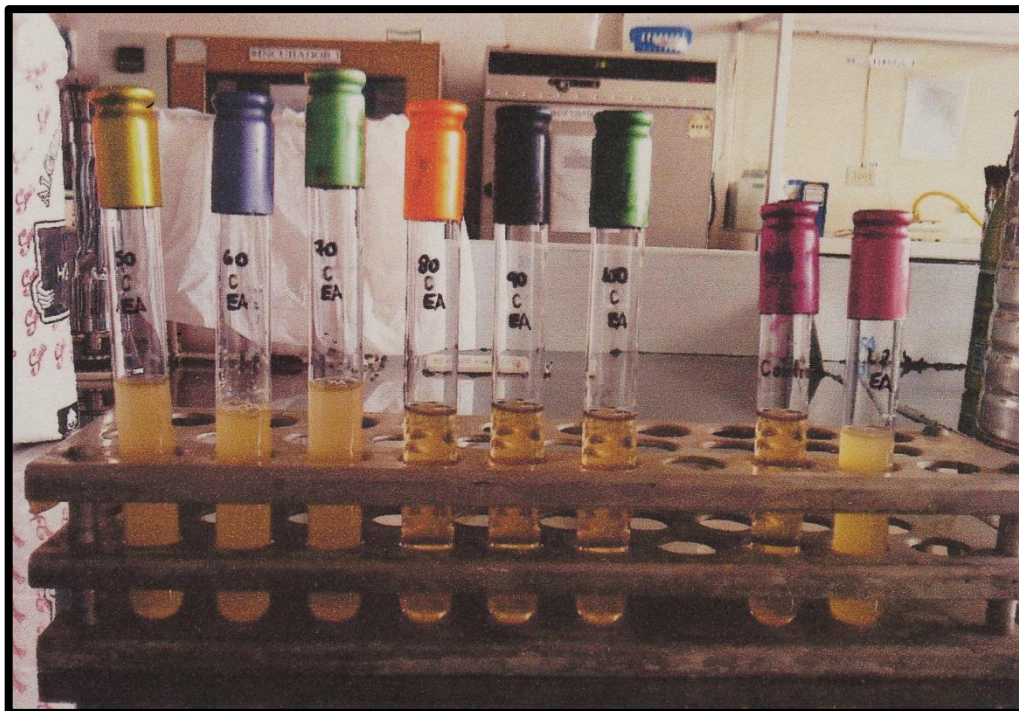
Lactobacillus C (Lactobacillus acidophilus) frente a E.coli



Lactobacillus C (*Lactobacillus acidophilus*) frente a *S. typhi* ATCC14028.

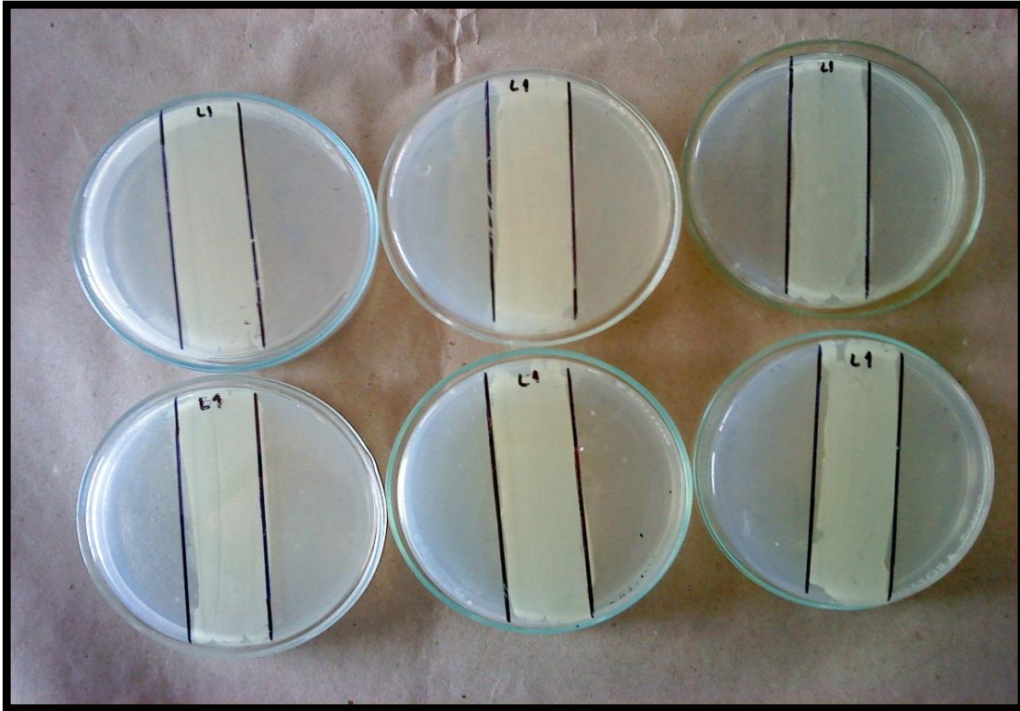


Lactobacillus C (*Lactobacillus acidophilus*) frente a *E. coli* ATCC 11775

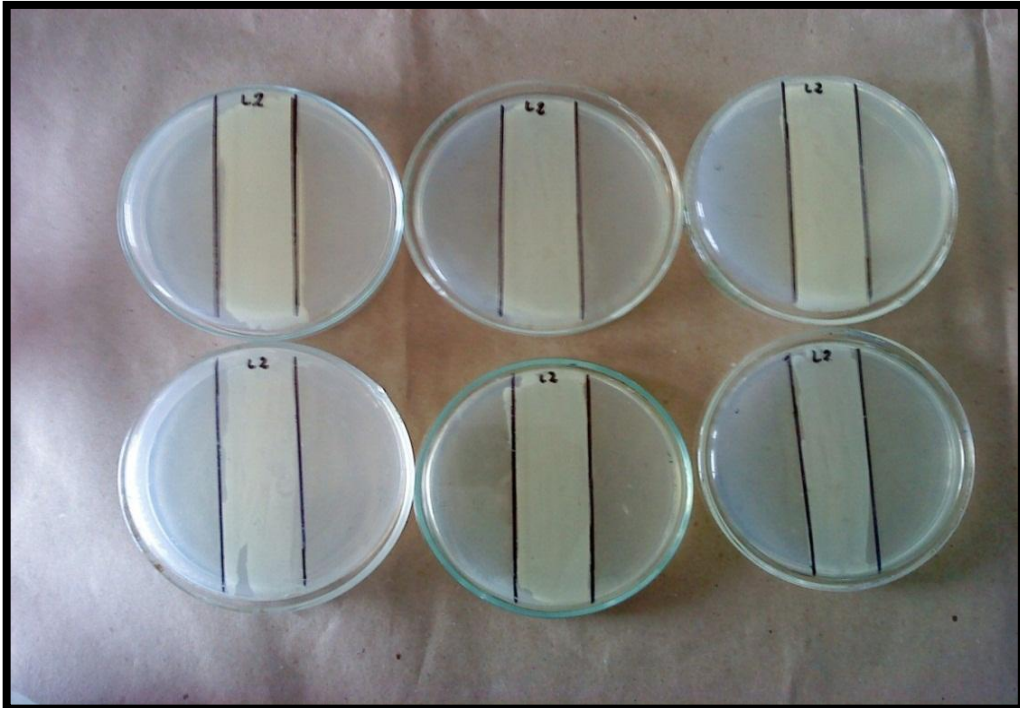


Anexo 4. Resultados de la inhibición en agar

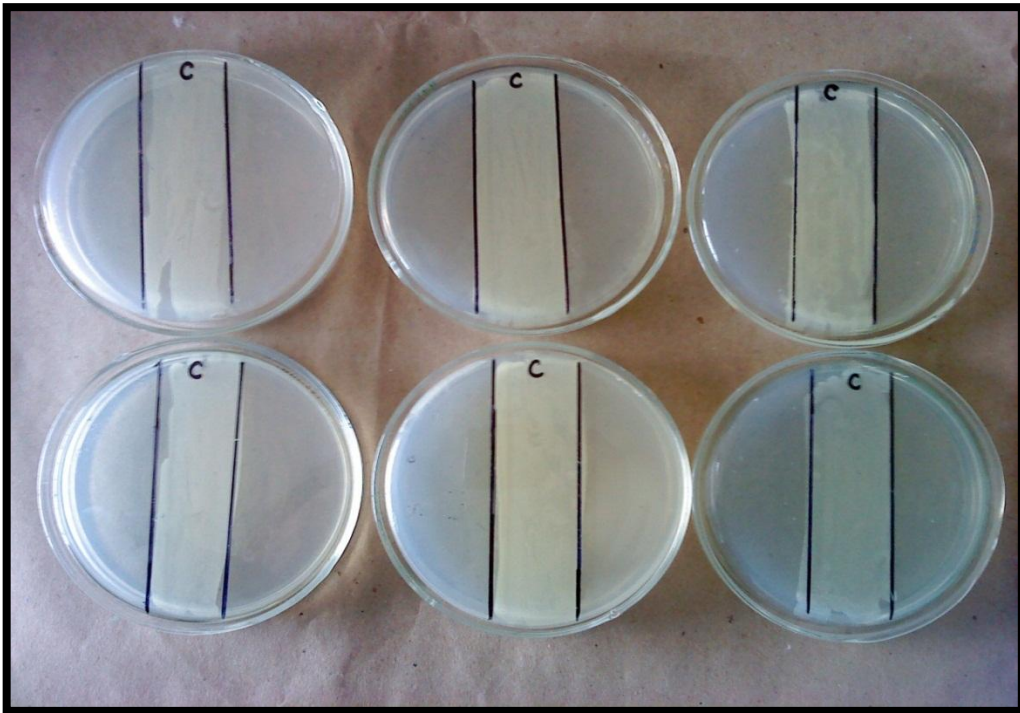
Crecimiento en franja del Lactobacillus L1 (Lactobacillus bulgaricus)



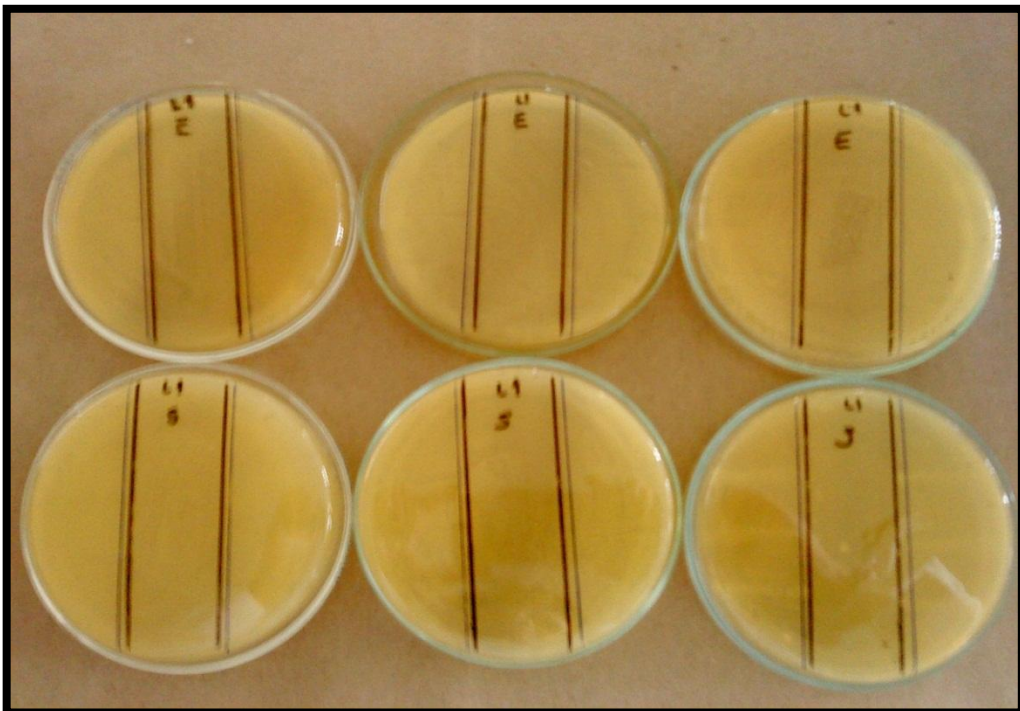
Crecimiento en franja del Lactobacillus L2 (Lactobacillus rhamnosus)

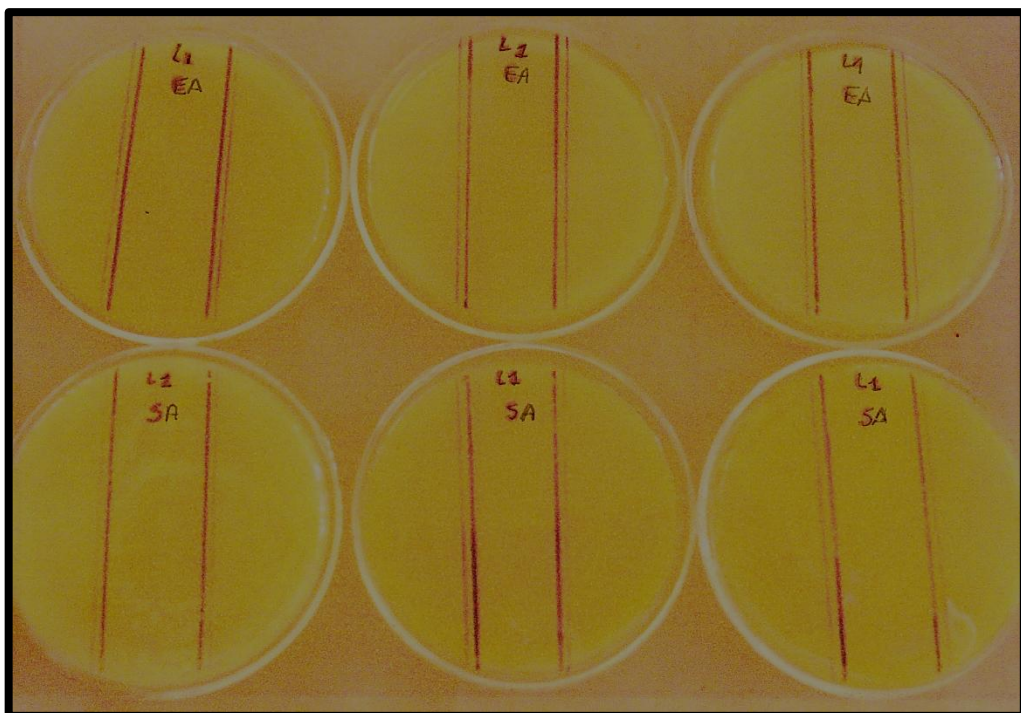


Crecimiento en franja del Lactobacillus C (Lactobacillus acidophilus)



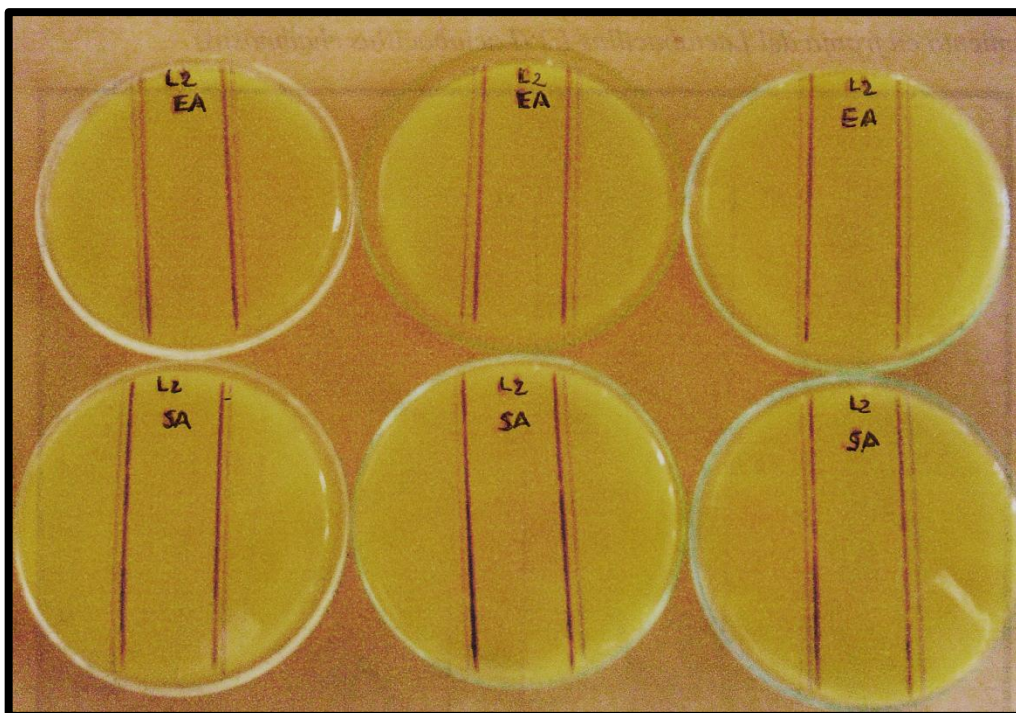
Inhibición del Lactobacillus L1 (Lactobacillus bulgaricus)





Inhibición del Lactobacillus L2 (Lactobacillus rhamnosus)





Inhibición del Lactobacillus C (Lactobacillus acidophilus)



